

CARMEN ANTONIA SANCHES ITO

**ÁCIDO NALIDÍXICO COMO MARCADOR PREDITIVO DE SENSIBILIDADE ÀS
FLUORQUINOLONAS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE UROCULTURA**

CURITIBA

2004

CARMEN ANTONIA SANCHES ITO

**ÁCIDO NALIDÍXICO COMO MARCADOR PREDITIVO DE SENSIBILIDADE ÀS
FLUORQUINOLONAS PARA *Escherichia coli* ISOLADAS DE UROCULTURA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Libera Maria Dalla Costa

CURITIBA

2004

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de pesquisa é sempre uma tarefa que conta com a contribuição de inúmeras pessoas e de várias instituições, cujos nomes quero deixar registrados aqui.

Prof.^a Dr.^a Libera Maria Dalla Costa, que aceitou orientar este trabalho e que me deu muitas de suas horas de lazer.

Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná – equipes de:

Bacteriologia: Adriane Ceschin Maestri, Aurora da C. F. da Silva Faria, Cecília Kazuko Goya, Cesar Renato Zambao, Dilair Camargo de Souza, Eliane Meri B. Mendes, Gislene Maria D. Botão, Helena Aguilar P. H. M. de Souza, Irene de Moraes, Izabel Joana de Lima, Jaqueline Sena Duraes, Jussara Kasuko Palmeiro, Keite da Silva Nogueira, Laura Lucia Cogo, Luciana Costa, Mara de Fatima C. Hack, Margareth Indiukov Neves, Maria Bernadete Mira, Maria Estela M. de Lima, Marisa Viante Rossi, Maristela de Paiva Lima, Marli Terezinha Karpstein, Marluza Ap^a Ramos Andrade, Roberto Ribeiro dos Santos, Rosalia Rubel, Rute Ricardo da Silva, Sugleri, Zozimo Oractz Neto.

Central de Soluções: Acir de Miranda Saiz, Josiane Meyer, Maria Olívia Mendes de Camargo, Paulo de Tarso Túllio, Pedro Horlap.

Virologia: Meri Bordignon Nogueira, Sonia Mara raboni, Clyete Santos da Silveira.

Imunogenética: Noemi Farah Pereira, Ana Lucia Vieira Mion, Marcia Fabricio de Melo.

Escola Paulista de Medicina – Laboratório Especial de Microbiologia Clínica e Laboratório de Retrovirologia, especialmente a Dr.^a Ana Cristina Gales, Patrícia Munerato, Maria Cristina Tognim, Liana Carballo Menezes e Andréa Pereira.

Os amigos Luine Rosele Renaud Vidal Tsuchiya e Waldemar de Paula Junior.

Altair Coelho, do Laboratório Alpha, e sua equipe, especialmente as amigas Larissa Bail, Adriana Van Santen e Ana Cristina Defino.

César Roberto Busato e Juarez Gabardo.

As empresas Newprov, Bristol-Myers Squibb, Merck Sharp & Dohme e Bayer, pelo fornecimento de parte do material.

Miguel Sanches Neto.

Marcos Ito e Julia Sanches Ito, por terem compreendido minhas longas ausências da vida familiar.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 QUINOLONAS.....	3
2.2 DESCOBERTA E EVOLUÇÃO.....	3
2.3 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE.....	8
2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS QUINOLONAS.....	11
2.5 EFEITOS ADVERSOS	12
2.6 INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA	13
2.7 MECANISMO DE AÇÃO	13
2.8 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS.....	19
2.8.1 Mutações nos genes que codificam para DNA girase e Topoisomerase IV	22
2.8.2 Bombas de efluxo	28
2.8.3 Resistência mediada por plasmídios	29
2.9 PREVENÇÃO DE SELEÇÃO DE MUTANTES.....	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 AMOSTRAS.....	34
4.1.1 Estocagem das amostras bacterianas.....	34
4.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR DISCO- DIFUSÃO EM ÁGAR	35
4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR.....	36
4.3.1 Preparo das soluções de antibióticos	37
4.3.2 Preparo das placas de Mueller-Hinton ágar com antimicrobiano	39
4.3.3 Procedimento técnico do teste de diluição em ágar	41

4.4 PESQUISA DE MUTAÇÕES NA REGIÃO DETERMINANTE DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS (QRDR) DOS GENES <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	44
4.4.1 Extração do DNA bacteriano	44
4.4.2 Amplificação da QRDR dos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> por PCR.....	45
4.5 SEQÜENCIAMENTO DO PRODUTO AMPLIFICADO	46
4.5.1 Purificação do produto de PCR	46
4.5.2 Seqüenciamento.....	46
4.5.3 Precipitação de DDNTPs não incorporados	47
4.5.4 Determinação da seqüência do DNA.....	47
4.6 SÍNTESE DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS NESTE TRABALHO	48
5 RESULTADOS	50
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	50
5.2 TESTES DE SENSIBILIDADE ÀS QUINOLONAS POR DISCO-DIFUSÃO	52
5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	54
5.4 PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	63
5.4.1 Amplificação das QRDRs dos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	63
5.4.2 Seqüenciamento das QRDRs dos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	65
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	DIVISÃO DAS PRINCIPAIS QUINOLONAS.....	12
TABELA 02 -	ATIVIDADE DA TROVAFLOXACINA EM COMPARAÇÃO COM A CIPROFLOXACINA NOS DOIS PRINCIPAIS SÍTIOS DE AÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES BACTERIANAS.....	19
TABELA 03 -	MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
TABELA 04 -	MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM <i>Escherichia coli</i>	25
TABELA 05 -	MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
TABELA 06 -	MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM <i>Staphylococcus aureus</i>	27
TABELA 07 -	MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM <i>Streptococcus pneumoniae</i>	27
TABELA 08 -	COMPONENTES DO SISTEMA DE EFLUXO DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS.....	29
TABELA 09 -	CONCENTRAÇÕES DOS ANTIMICROBIANOS TESTADAS PARA AMOSTRAS DE <i>E. coli</i>	38
TABELA 10 -	INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA QRDR DOS GENES <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	45
TABELA 11 -	PERCENTUAL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS DETECTADO PELO MÉTODO AUTOMATIZADO.....	51
TABELA 12 -	DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO.....	52
TABELA 13 -	DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS E PERCENTUAL CUMULATIVO POR CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR.....	55
TABELA 14 -	POTÊNCIA E ATIVIDADE DOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR EM 385 AMOSTRAS <i>E.</i> <i>coli</i>	56
TABELA 15 -	PERCENTUAL DE SENSIBILIDADE À NITROFURANTOÍNA E AO SULFAMETOXAZOL/TRIMETOPRIM EM AMOSTRAS SENSÍVEIS E RESISTENTES ÀS QUINOLONAS.....	57
TABELA 16 -	RESULTADO DO TESTE DE ACURÁCIA DOS MÉTODOS DE DIFUSÃO E DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA OS 385 ISOLADOS DE <i>E.</i> <i>coli</i>	58
TABELA 17 -	DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (AD) DA	

CIPROFOXACINA DOS 385 ISOLADOS DE <i>E. coli</i>	63
TABELA 18 - LOCALIZAÇÃO E TIPO DE MUTAÇÕES NOS GENES <i>gyrA</i> E <i>parC</i> POR GRUPO DE AMOSTRAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 -	ESTRUTURA BÁSICA DAS QUINOLONAS.....	08
FIGURA 02 -	PRINCIPAIS SUBSTITUINTES NA MOLÉCULA DAS QUINOLONAS.....	10
FIGURA 03 -	NUCLEÓIDE E FORMAÇÃO EM ALÇA DO DNA BACTERIANO.....	16
FIGURA 04 -	REGIÃO 4 α -HÉLICE DA DNA GIRASE.....	16
FIGURA 05 -	COMPLEXO TERNÁRIO: DNA GIRASE-DNA-QUINOLONAS.....	17
FIGURA 06 -	PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS....	21
FIGURA 07 -	JANELA DE SELEÇÃO DE MUTANTES.....	32
FIGURA 08 -	ESTRUTURA QUÍMICA DA QUINOLONAS UTILIZADAS.....	36
FIGURA 09 -	EXEMPLO DE DILUIÇÃO SERIADA DA SOLUÇÃO ESTOQUE DO ÁCIDO NALIDÍXICO.....	40
FIGURA 10 -	ESQUEMA SIMPLIFICADO DO MÉTODO DE ÁGAR DILUIÇÃO UTILIZADO.....	42
FIGURA 11 -	EXEMPLO DA DETERMINAÇÃO DA CIM DO ÁCIDO NALIDÍXICO PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO EM ÁGAR.....	43
FIGURA 12 -	DIAGRAMA SIMPLIFICADO DOS PROCEDIMENTOS TÉCNICOS REALIZADOS.....	49
FIGURA 13 -	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS FEMININAS E MASCULINAS POR FAIXA ETÁRIA.....	51
FIGURA 14 -	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE AMOSTRA E NÚMERO DE AMOSTRAS RESISTENTES PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO POR FAIXA ETÁRIA EM AMOSTRAS FEMININAS.....	53
FIGURA 15 -	DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE AMOSTRA E NÚMERO DE AMOSTRAS RESISTENTES PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO POR FAIXA ETÁRIA EM AMOSTRAS MASCULINAS.....	53
FIGURA 16 -	COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm (DD) COM A CIM EM $\mu\text{g/mL}$ (AD) DAS QUINOLONAS TESTADAS.....	60
FIGURA 17 -	COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm (DD) DO ÁCIDO NALIDÍXICO COM A CIM EM $\mu\text{g/mL}$ (AD) DA NORFLOXACINA, CIPROFLOXACINA E GATIFLOXACINA NAS 385 AMOSTRAS ESTUDADAS.....	61
FIGURA 18 -	PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>gyrA</i> e <i>parC</i> OBTIDOS DA AMOSTRA.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ala	- alanina
Arg	- arginina
Asn	- asparagina
Asp	- ácido aspártico
AUC	- área sob a curva
AUIC	- área sob a curva inibitória
CIM	- concentração inibitória mínima
CIP	- ciprofloxacina
dATP	- dinucleotídeo adenosina trifosfato
dCTP	- dinucleotídeo citosina trifosfato
DDNTP	-- dideoxidinucleotídeo trifosfato
dGTP	- dinucleotídeo guanosina trifosfato
DMSO	- dimetilsulfóxido de sódio
DNTP	- dinucleotídeo trifosfato
dTTP	- dinucleotídeo timina trifosfato
Gln	- glicina
GTF	- gatifloxacina
<i>gyrA</i>	- gene que codifica para GyrA
GyrA	- subunidade A da DNA girase
<i>gyrB</i>	- gene que codifica para GyrB
GyrB	- subunidade B da DNA girase
His	- histidina
Ile	- isoleucina
Leu	- leucina
Lis	- lisina
mL	- mililitro
mm	- milímetro
n	- número de amostra
NAL	- ácido nalidíxico

NOR	- norfloxacin
NCCLS	- comitê nacional para padronização de laboratórios
<i>parC</i>	- gene que codifica para ParC
ParC	- subunidade C da Topoisomerase IV
<i>parE</i>	- gene que codifica para ParE
ParE	- subunidade E da Topoisomerase IV
Phe	- fenilalanina
Pro	- prolina
QRDR	- região determinante de resistência às quinolonas
Ser	- serina
SUT	- sulfametoxazol/trimetoprim
Thr	- triptofano
TSA	- teste de susceptibilidade aos antimicrobianos
Tyr	- tirosina
UFC	- unidades formadoras de colônias
Val	- valina
v/v	- volume a volume
µg	- micrograma
µL	- microlitro

RESUMO

A infecção do trato urinário é uma das patologias mais comuns na prática clínica. O principal agente etiológico é *Escherichia coli*. As quinolonas são amplamente utilizadas na terapêutica dessas infecções e o aumento da resistência a esses fármacos é preocupante. Neste estudo, avaliou-se o padrão de susceptibilidade de 385 amostras de *E. coli* isoladas de urocultura. Os métodos utilizados foram disco-difusão e diluição em ágar. Testaram-se as seguintes quinolonas: ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacina e gatifloxacina. Foram pesquisadas mutações nos genes *gyrA* e *parC* em doze amostras, das quais duas eram sensíveis às quinolonas, cinco resistentes somente ao ácido nalidíxico e cinco resistentes a todas as quinolonas. Das 385 amostras de *E. coli*, 53 foram classificadas como resistentes a pelo menos uma quinolona testada. Ciprofloxacina apresentou maior potência ($CIM_{50} \leq 0,015 \mu\text{g/mL}$), entretanto, o percentual de sensibilidade foi igual ao da norfloxacin (91,4%) e ligeiramente menor do que o da gatifloxacina (92,7%). O ácido nalidíxico apresentou potência ($CIM_{50} = 2 \mu\text{g/mL}$) e sensibilidade (86,2%) menores do que as apresentadas pelas fluorquinolonas. A comparação entre os métodos de difusão e diluição em ágar mostrou uma boa relação para as quinolonas testadas, sensibilidade entre 97%-98% e especificidade de 100%. O ácido nalidíxico revelou-se um bom marcador preditivo da sensibilidade às fluorquinolonas em *E. coli* no teste de difusão em ágar, a sensibilidade desse método de triagem foi de 100% e especificidade de 95%. No sequenciamento, as amostras sensíveis às quinolonas não apresentaram mutações; naquelas resistentes apenas ao ácido nalidíxico foi encontrada uma única mutação em *gyrA*, com elevação da CIM para as demais quinolonas testadas. Nas amostras resistentes, foram observadas três mutações, duas em *gyrA* e uma em *parC*. Com base nos resultados encontrados neste estudo, sugerimos o uso do ácido nalidíxico como marcador preditivo de sensibilidade de *E. coli* às fluorquinolonas.

Palavras-chave: infecção urinária, resistência às quinolonas, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Urinary tract infection is one of the most usual pathologies in clinical practice. *Escherichia coli* is the main etiologic agent. Quinolones are widely used as a therapeutic agent in these infections. In this study 385, it has been evaluated 385 *E. coli* isolates from urine culture by using disk-diffusion and agar-dilution tests. The following quinolones were tested: nalidixic acid, norfloxacin, ciprofloxacin and gatifloxacin. Twelve strains were tested for presence of mutation in gene *gyrA* and *parC*, two strains were susceptible, five were only resistant to nalidixic acid and five were resistant to all quinolones tested. From 385 strains *E. coli* tested, 53 were classified as resistant to at least one quinolone tested. Ciprofloxacin has shown the highest potency ($MIC_{50} \leq 0.015 \mu\text{g/mL}$), however, the percentage of sensibility was similar to norfloxacin (91,4%), but less than gatifloxacin (92,7%). Nalidixic acid has shown potency ($MIC_{50} = 2 \mu\text{g/mL}$) and susceptibility (86,2%) lower than for fluoroquinolones. Comparison between the disk-diffusion and agar-dilution showed a good relation for quinolones tested, sensibility of 97%-98% and specificity of 100%. The nalidixic acid it shown a good marker predictive of the sensibility to fluoroquinolones in *E. coli* in the disk-diffusion test, this screening method provided a sensibility of 100% and specificity of 95%. From sequenced strains, the susceptible to quinolones has not presented mutations, in those resistant strains to nalidixic acid, only one mutation in *gyrA*, with increasing MIC for the other quinolones tested were found and in resistant strains to all quinolones only three mutations, two in *gyrA* gene and one in *parC* gene were found. On the base of results found in this study we suggest to use nalidixic acid as a predictive marker of sensibility to fluoroquinolones in *E. coli*.

Key-words: urinary infection, quinolones resistance, *Escherichia coli*.

1 INTRODUÇÃO

As quinolonas representam um importante avanço na terapêutica antimicrobiana das infecções, comunitárias e hospitalares, do trato urinário, onde *Escherichia coli*, continua sendo o principal agente etiológico nas infecções agudas.

O ácido nalidíxico foi o primeiro antimicrobiano desse grupo utilizado clinicamente. Na década de 80, as fluorquinolonas foram introduzidas na terapêutica antiinfecçiosa. Esta classe possui compostos administráveis, por via oral e parenteral, amplo espectro de atividade para vários tipos de infecção, incluindo infecção complicada do trato urinário (ITU), infecções gastrointestinais, doenças sexualmente transmissíveis, infecções do trato respiratório e osteomielite crônica. A emergência de bactérias resistentes foi observada logo após o uso terapêutico das fluorquinolonas, especialmente em isolados nosocomiais. Mas a preocupação se intensificou com o aumento do relato de resistência em infecções adquiridas na comunidade por *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae* e espécies de *Salmonella* e *Campylobacter* (ACAR & GOLDSTEIN, 1997).

Algumas classes de antimicrobianos podem ser avaliadas quanto à resistência por meio de um marcador, que tem a função de triagem. No caso das quinolonas, há indícios de que o ácido nalidíxico possa exercer este papel. Apenas uma mutação no gene responsável pela codificação do sítio alvo confere resistência a este fármaco, enquanto as fluorquinolonas podem apresentar diminuição na potência, detectada somente pela elevação da concentração inibitória mínima (CIM).

O objetivo deste trabalho foi determinar a potência e atividade das quinolonas em *E. coli* isoladas de infecção do trato urinário, bem como pesquisar o principal mecanismo genético envolvido na resistência. Objetivou-se ainda, correlacionar a SENSIBILIDADE do ácido nalidíxico com as fluorquinolonas. As quinolonas testadas foram o ácido nalidíxico (NAL), norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP) e gatifloxacina (GTF). A susceptibilidade às quinolonas foi determinada por dois testes, difusão em ágar e diluição em ágar como método de referência. Nitrofurantoína (NIT) e sulfametoxazol/trimetoprim (SUT) foram testados como opções terapêuticas.

Foi realizada ainda amplificação e sequenciamento da região que determina resistência às quinolonas (QRDR) dos genes *gyrA* e *parC*, para relacionar o nível de resistência com a presença de possíveis mutações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUINOLONAS

As quinolonas representam uma classe de antimicrobianos composta por drogas estruturalmente semelhantes, totalmente sintéticas. Agentes bactericidas, dependentes da concentração, que podem ser administrados por via oral ou endovenosa. A manipulação do núcleo quinolônico levou ao desenvolvimento de várias quinolonas que são agrupadas em diferentes gerações (ANDRIOLE, 1998).

A introdução do flúor na posição seis do anel quinolônico melhorou a atividade antimicrobiana, recebendo a denominação de fluorquinolonas. As fluorquinolonas são indicadas na terapêutica da infecção do trato urinário (ITU), doenças sexualmente transmissíveis, infecções gastrintestinais e abdominais, infecções do trato respiratório, infecções ósseas e articulares, da pele e suas estruturas, infecções sistêmicas e na prevenção ou erradicação da colonização (HOOPER, 2000).

Essa classe de agentes terapêuticos, em contínua expansão, tem sido usada clinicamente em grande escala, tanto em pacientes hospitalares quanto em ambulatoriais (HOOPER, 2000).

ENA et al. (1998) advogam que as taxas de resistência às fluorquinolonas são mais elevadas em países em desenvolvimento. Isso dar-se-ia em função da utilização de quinolonas menos potentes, como o ácido nalidíxico, ou ainda pelo uso de regimes incompletos de compostos mais potentes, como a ciprofloxacina. Já em países desenvolvidos, o aumento de resistência estaria ainda associado ao crescimento no consumo geral de quinolonas, infecções urinárias complicadas e ao amplo uso de catéter vesical.

2.2 DESCOBERTA E EVOLUÇÃO

Primeira quinolona de uso clínico, o ácido nalidíxico foi descoberto acidentalmente por Leshner em 1962, durante a síntese de um composto antimalárico, a cloroquina. Naquela época, constituía uma boa opção terapêutica

para o tratamento de infecções urinárias, pois apresentava atividade satisfatória contra bactérias Gram negativas aeróbias (BARLOW, 1963). Porém, a atividade limitada às enterobactérias e o fato de não alcançar concentração sérica adequada restringiram a indicação do ácido nalidíxico para o tratamento de infecções urinárias não complicadas (ANDRIOLE, 1996).

Nos anos 70, outras quinolonas, como o ácido oxonílico e a cinoxacina, foram sintetizadas. Apesar de possuírem atividade antimicrobiana discretamente superior à do ácido nalidíxico, tais compostos não constituíram descoberta significativa. Quase que paralelamente, foi desenvolvido, no Japão, o ácido pipemídico, que já apresentava alguma atividade, ainda que limitada, contra *Pseudomonas aeruginosa*. Com características farmacocinéticas semelhantes ao NAL, ele também é indicado para infecções urinárias não complicadas (ANDRIOLE, 1996).

A identificação da enzima DNA girase em 1976, levou a uma melhor compreensão do mecanismo de ação, possibilitando o desenvolvimento das quinolonas. Outro fator significativo foi a capacidade de manipular o núcleo quinolônico, levando à obtenção de inúmeras substâncias substituídas em várias posições no anel central, com melhora nas propriedades farmacocinéticas, aumento na meia-vida e ampliação da atividade antibacteriana (ANDRIOLE, 1996).

Com a incorporação da molécula de flúor na posição 6 do anel quinolônico houve um aumento importante na potência em relação às bactérias Gram negativas e a ampliação do espectro de ação para as bactérias Gram positivas. Essas quinolonas passaram a ser chamadas de fluorquinolonas (DOMAGALA, 1986).

Lançada em 1986, a primeira quinolona desse grupo foi a norfloxacin, que apresenta excelente atividade em bactérias Gram negativas aeróbias, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, e boa atividade também contra bactérias Gram positivas. Indicada para infecções urinárias, infecções gonocócicas uretrais e cervicais não complicadas e prostatite e infecções gastrointestinais, embora com limitações em termos de farmacocinética e farmacodinâmica (TAVARES, 1996).

Logo após, outras fluorquinolonas, como ciprofloxacina (1987) e a ofloxacina (1991), foram lançadas, apresentando alta absorção intestinal e ótima penetração na maioria dos órgãos e tecidos, com excelente potência e espectro de ação contra bactérias Gram negativas e Gram positivas (ANDRIOLE, 1998).

O uso hospitalar desses fármacos iniciou com as quinolonas de “segunda geração” em função da melhoria nos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, que permitiu a administração por via oral e endovenosa, a redução das doses diárias, a ampliação do espectro de ação antimicrobiano e a elevação da potência bactericida (TAVARES, 1996).

Até então, estas quinolonas apresentavam atividade relativamente baixa contra algumas bactérias Gram positivas, especialmente *Streptococcus pneumoniae*. A atividade delas também era restrita contra bactérias anaeróbicas e contra os agentes etiológicos responsáveis pelas “pneumonias atípicas”, tais como *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* (ANDRIOLE, 1998).

Novas modificações deram origem aos análogos di e tri-fluorados do ácido nalidíxico, criando a terceira geração das quinolonas, representadas pela esparfloxacina (1997), temafloxacina (1992), grepafloxacina (1998), levofloxacina (1997) e lomefloxacina (1992). Destas, somente a levofloxacina se encontra disponível comercialmente no Brasil (MENDES, 1998).

Esta geração possui maior potência contra Gram positivos, especialmente *Streptococcus pneumoniae*. São usadas com segurança no tratamento de infecções de vias aéreas, atingindo ótimas concentrações no sangue e tecidos, embora ainda possuam atividade limitada contra anaeróbios Gram negativos e os agentes das pneumonias atípicas. Alguns destes compostos também apresentam meia-vida longa, o suficiente para permitir administração uma vez ao dia (ANDRIOLE, 1998).

Apesar das melhoras efetuadas nesse grupo, a toxicidade também foi ampliada, limitando o uso de alguns representantes. O primeiro composto desta geração, a temafloxacina, foi lançada no início da década de 90. Foi retirada rapidamente do mercado por apresentar efeitos tóxicos, que incluem principalmente vasculites, alterações de coagulação e hepatotoxicidade (BLUM, 1994).

Outros representantes desse grupo também demonstraram problemas de toxicidade, como a esparfloxacina que, embora cause fototoxicidade, foi liberada para o uso intra-hospitalar nos Estados Unidos. Já a grepafloxacina foi associada a relatos de casos graves de toxicidade (FINCH, 1996).

Mais recentemente surgiu um novo grupo de quinolonas, também denominado por alguns pesquisadores como “quinolonas respiratórias” (BLONEAU,

1999; LOBER, 1999). Ainda não há consenso quanto ao agrupamento das novas quinolonas em gerações. Entretanto alguns pesquisadores colocam essas novas substâncias numa quarta geração de quinolonas, pelo fato de apresentarem atividade contra bactérias anaeróbias e potência ainda superior contra Gram positivos (AMYES, 1997).

Esses compostos possuem meia-vida prolongada e melhor desempenho em termos de farmacocinética, farmacodinâmica, e potência antimicrobiana, podendo ser utilizados em dose única diária (BERGAN, 1998).

Com o avanço da atividade sobre bactérias Gram positivas, atípicas e anaeróbicas, estas novas quinolonas são usadas com segurança para o tratamento de infecções de vias aéreas. As principais quinolonas incluídas nesta quarta geração são a trovafloxacin (1997), gatifloxacin (1999), moxifloxacin (1999) e clinafloxacin (1999) (KING, 2000).

A trovafloxacin foi restrita ao uso hospitalar nos Estados Unidos e foi retirada do mercado europeu por problemas relacionados à toxicidade hepática. Esses problemas parecem estar associados à sua estrutura química e ao fato de apresentar eliminação predominantemente gastrointestinal (SMITH, 1997).

Em estudos *in vitro*, clinafloxacin mostrou ser um potente composto desta geração contra bactérias Gram negativas e Gram positivas (EDNIE, 1998; CLARK, 1999) e contra bactérias anaeróbias (SNYDMAN, 2000). O uso desta fluorquinolona é, entretanto, restrito por causa de efeitos adversos, como fototoxicidade e hipoglicemia (ZHANEL *et al*, 2002).

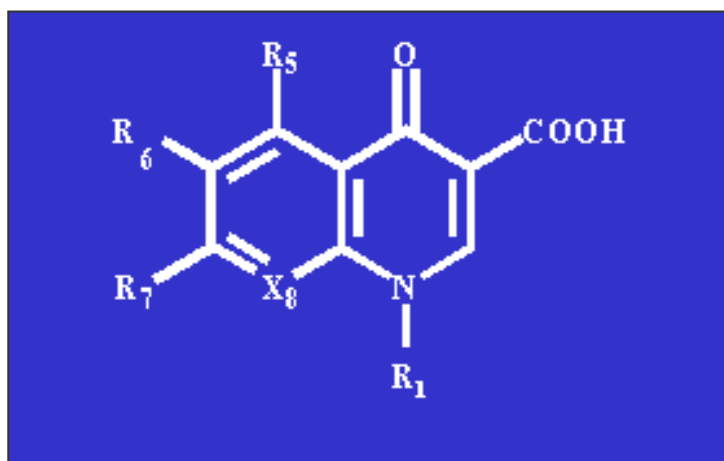
Gatifloxacin e moxifloxacin, disponíveis no Brasil, representam um importante avanço na evolução das quinolonas. Possuem maior potência e maior espectro de ação contra os principais patógenos responsáveis por infecções do trato respiratório, contra enterobactérias e outras bactérias Gram negativas. Maior potência, associada à posologia de uma vez ao dia e à baixa toxicidade, propicia uma contribuição significativa para o tratamento de vários tipos de infecções comunitárias e hospitalares. No entanto, como para qualquer outro novo antimicrobiano de amplo espectro, sua utilização deve ser bastante criteriosa para evitar o rápido desenvolvimento de resistência (GALES, 2001).

2.3 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE

A estrutura básica das quinolonas compreende um ciclo comum (Figura 1), o ácido 4-oxo-1,4-diidropiridino-3-carboxílico condensado na posição orto com outro ciclo de natureza aromática, sendo que este núcleo é denominado 4-oxo-1,4-quinolona ou simplesmente 4-quinolona (CARVALHO, 1998).

Nem todas as quinolonas desenvolvidas apresentam este núcleo principal, algumas possuem estrutura química, características farmacológicas e antimicrobianas semelhantes. Esses análogos podem pertencer ao grupo das naftiridinas, cinolinas, piridopirimidinas e 2-piridonas. Contudo, todos os compostos disponíveis atualmente são quinolinas ou naftiridinas (SUH, 1995; HOOPER, 2000).

FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA DAS QUINOLONAS



FONTE: HOOPER, 2000

As modificações estruturais produziram importantes alterações, exercendo influência na atividade antimicrobiana, aumentando a afinidade com o sítio alvo, melhorando a penetração nas células e alterando a farmacocinética ou a toxicidade das quinolonas. Os principais radicais substituintes e a posição no anel quinolônico podem ser observados na Figura 2.

As pesquisas demonstram que modificações estruturais em todas as posições (Figura 1) no núcleo quinolônico, exceto no grupo 4-oxo, produzem potentes agentes antimicrobianos (ZHANG, 1991).

A posição 1 do anel quinolônico está relacionada à ligação com o sítio alvo, requer a presença de substituintes, já que aquelas que não o possuem são inativas. A atividade é aumentada com grupos como etila, ciclopropila, terc-butila e derivados fenílicos. Os radicais que proporcionam maior potência são ciclopropila e 2,4-difluorfenila.

A presença de substituintes na posição 2 leva à inatividade (ZHANG, 1991).

As posições 3 e 4 são consideradas críticas para a atividade das quinolonas e nenhuma substituição útil tem sido relatada. Logo, a 3-carboxila e a 4-carbonila devem ser mantidas (ZHANG, 1991; BRYSKIER, 1995).

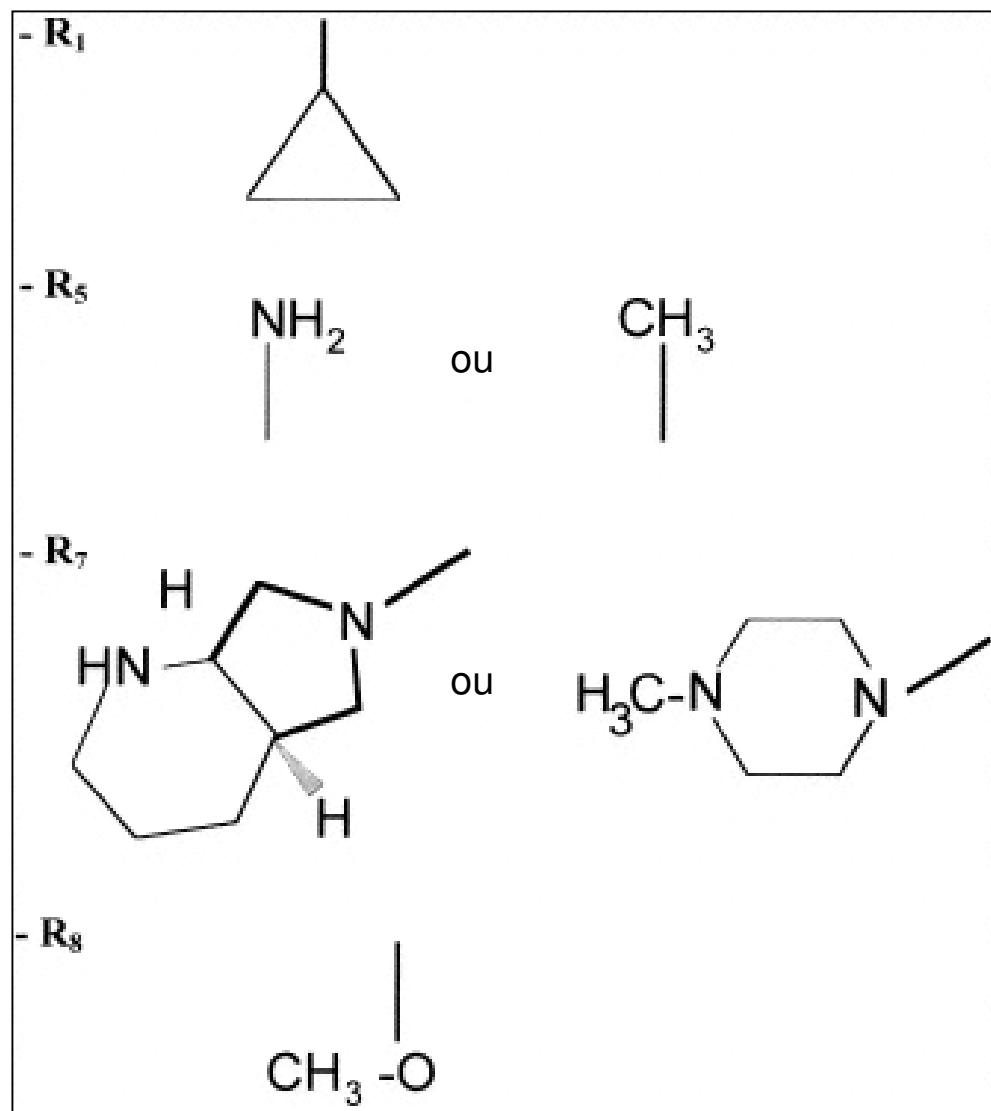
Fatores estéricos devem ser levados em consideração para substituições na posição 5, pois pode ocorrer alteração da estrutura planar da molécula. Normalmente, esta posição não contém substituinte, no entanto, a introdução de um grupo metila, hidroxila ou amina melhora a atividade biológica contra Gram positivas. Esta posição depende também da variação do substituinte no carbono 7. (BRYSKIER, 1995; WAGSTAFF, 1997).

A adição de um átomo de flúor na posição 6 eleva consideravelmente a atividade antibacteriana, aumentando a afinidade pela enzima e a penetração nas células. Essa modificação é encontrada com frequência entre os compostos quinolônicos com sucesso clínico (CARVALHO, 1998).

Os substituintes em carbono 7 determinam o espectro antimicrobiano e desempenham, ainda, maior papel no controle da permeabilidade da célula bacteriana. Grupos como hidroxipurrolinil, aminopirrolidinil, metilpiperazinil e piperazinil conferem alta afinidade do composto ao sítio alvo, aumentando sua atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (SUH, 1995; BRYSKIER, 1995).

Substituindo-se o carbono 8 por um átomo de nitrogênio, produzem-se as 1,8-naftiridinas, que possuem excelente atividade. A adição de flúor, assim como a presença de anel oxazilínico entre esta posição e o N-1, confere potente atividade aos compostos (CARVALHO, 1998). No entanto, a adição de grupos nitro ou amino diminui a atividade, sendo menor que a dos não substituídos (ZHANG, 1991).

FIGURA 2 - PRINCIPAIS SUBSTITUINTES NA MOLÉCULA DAS QUINOLONAS



FONTE: PETERSON, L.R, 2001

NOTA: R₁: CiclopropilaR₅: Amino ou MetilaR₇: Aminopirrolidina ou piperazinaR₈: Metoxila

2.4 CLASSIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS QUINOLONAS

Algumas classes de antibióticos como as cefalosporinas e quinolonas apresentam vários representantes e são normalmente agrupadas em gerações.

Em relação às quinolonas, há divergências entre os autores e classificações baseadas nas estruturas químicas ou atividades biológicas têm sido propostas. Entretanto, o número de novos compostos sintetizados, com diversas estruturas químicas e atividades antimicrobianas, dificulta a elaboração de uma classificação prática e completa (BRYSKIER & CHANTOT, 1995).

Alguns autores fazem a divisão levando em consideração espectro de ação; outros, o período de lançamento (KING et al., 2000). A divisão didática das principais quinolonas, a seguir, resumizada na Tabela 1, foi baseada nestes aspectos.

A primeira geração tem uso restrito às infecções urinárias não complicadas, pois alcançam baixos níveis séricos e têm ação predominantemente sobre bacilos Gram negativos. O ácido nalidíxico e o ácido pipemídico são os representantes do grupo.

Na segunda geração encontram-se a norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin e perfloxacin. A norfloxacin tem baixo tempo de meia-vida e espectro estreito de ação, além de não alcançar bons níveis séricos, ficando restrito às infecções urinárias baixas. As demais fluorquinolonas deste grupo alcançam bons níveis séricos e são usadas em todas as infecções urinárias, infecções do trato respiratório por bacilos Gram negativos e infecções de pele. A ciprofloxacin é a quinolona com maior atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e ainda apresenta a vantagem de ter boa penetração óssea.

A terceira geração é representada pela esparfloxacin, grepafloxacin, levofloxacin e lomefloxacin. Administradas uma vez ao dia, possuem espectro ampliado para Gram positivos e bactérias atípicas. Indicadas em pneumonia adquirida na comunidade, exacerbação aguda da bronquite crônica, infecções urinárias e de pele.

Na quarta geração encontram-se os mais novos representantes das quinolonas, como a clinafloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin e trovafloxacin. Possuem espectro ampliado incluindo Gram positivos, anaeróbios e atípicos. São usadas em infecções intra-abdominais, urinárias, pneumonia nosocomial e adquirida

na comunidade, com a vantagem de agir contra *Streptococcus pneumoniae* resistente às penicilinas e cefalosporinas.

TABELA 1 - DIVISÃO DAS PRINCIPAIS QUINOLONAS

GERAÇÃO	REPRESENTANTES
Primeira geração	Ácido nalidíxico, ácido pipemídico
Segunda geração	Norfloxacin, ciprofloxacina, perfloxacina, ofloxacina
Terceira geração	Esparfloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina
Quarta geração	Gatifloxacina, moxifloxacina

2.5 EFEITOS ADVERSOS

As quinolonas são medicamentos de boa tolerância, sendo referidos efeitos adversos em 5 a 10% dos pacientes que as utilizam. Na maioria dos casos as queixas relacionam-se à esfera digestiva, com náuseas, vômitos, diarreias e dor abdominal. Manifestações de hipersensibilidade não são comuns, mas podem surgir sob a forma de urticária, eosinofilia, erupções maculopapulares e febre (TAVARES, 1999).

Esses quimioterápicos podem causar efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central, em frequência variável e dependendo da dose. Manifesta-se por sonolência, cefaléia, insônia, tonteadas, fadiga, depressão e até convulsão. Fotossensibilidade, manifestada pelo escurecimento da pele em exposição à luz solar, é ocorrência freqüente com o uso prolongado das fluorquinolonas, em especial a perfloxacina (ANDRIOLLE, 1998).

O uso em crianças, adolescentes, mulheres grávidas ou nutrizes não é recomendado pelo fato de haver riscos destes medicamentos causarem lesões articulares e interferirem no crescimento ósseo (TAVARES, 1999).

2.6 INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA

A principal interação medicamentosa das quinolonas é com antiácidos contendo alumínio e magnésio. A administração concomitante de antiácidos contendo hidróxido de alumínio reduz a absorção das quinolonas. Portanto, a administração deve ser 1 a 2 horas antes da ingestão de antiácidos ou pelo menos 4 horas depois. Esta restrição não se aplica aos bloqueadores dos receptores H₂. Quinolona administrada simultaneamente com teofilina pode resultar em aumento da concentração plasmática da teofilina, eventualmente desencadeando efeitos colaterais induzidos pela mesma. Nos casos em que a administração simultânea é indispensável, são necessários a monitorização das concentrações séricas de teofilina e o reajuste conveniente da dose. Estudos experimentais revelam que a associação de doses elevadas de quinolonas com alguns antiinflamatórios não esteróides, mas não com o ácido acetilsalicílico, pode causar convulsões. Em casos isolados, após a administração concomitante de ciprofloxacina e ciclosporina, foram observados aumentos transitórios da concentração de creatinina sérica, tornando necessário o controle rigoroso destes níveis (LOBER, 1999).

2.7 MECANISMO DE AÇÃO

As quinolonas inibem a síntese de DNA bacteriano e, em concentrações elevadas, inibem também a síntese de RNA. Esses efeitos são mediados pela habilidade desses compostos em estabilizar e inibir as topoisomerasas bacterianas do tipo II – DNA girase e Topoisomerase IV, complexo enzimático importante para a replicação do DNA (HOOPER, 2001).

O cromossoma bacteriano é formado por uma molécula de DNA circular, única e longa. Trabalhos com *E. coli* demonstram que o DNA apresenta uma estrutura compactada, dividida em domínios que formam alças (loop domain structure) para poder situar-se no interior da célula, ocupando um espaço mínimo, chamado de nucleóide (Figura 3), já que em extensão ele é 1500 vezes maior que a bactéria. Os domínios são intervalos de 50 kb do cromossomo, formando alças, que variam de 30 a 200 em número e estão fixadas por âncoras, produzindo uma

estrutura com aspecto de flor. A estrutura da âncora não é conhecida, mas elementos de seqüências repetidas (REP), além de proteínas, podem estar envolvidos (TRUN & MARKO, 1998).

O tamanho do DNA é extremamente reduzido pelas dobras na formação dos domínios em alça que ainda sofre um processo de superespiralização negativa, que recebe essa denominação porque o sentido é contrário ao sentido da hélice do DNA na sua forma linear. O processo de superespiralização reduz um pouco o tamanho do DNA, mas principalmente favorece as ligações entre as fitas de DNA intra-alça e evita o emaranhado de alças vizinhas (TRUN & MARKO, 1998).

Devido à característica compactada do DNA, a duplicação do cromossoma bacteriano passa por problemas topológicos durante a divisão celular. Para iniciar a replicação do DNA, a enzima DNA helicase desenrola a fita dupla de DNA antes que a DNA polimerase exerça sua ação. A abertura da fita junto com a ação da polimerase gera tensão na forquilha de replicação. Além disso, a transcrição de determinados genes resulta em superespiralização positiva, comprometendo a progressão da DNA polimerase. Outra questão relacionada à topologia do DNA ocorre ao final da duplicação cromossômica, onde as fitas filhas ficam entrelaçadas.

Esses e outros problemas topológicos da duplicação do DNA são resolvidos por um conjunto de enzimas denominadas topoisomerases que são capazes de romper a fita de DNA, passar a outra fita pelo local e reparar o local da ruptura. As enzimas que rompem e restauram fita simples são classificadas como topoisomerases do tipo I e são representadas pelas topoisomerases I e III. Aquelas que rompem e restauram fita dupla pertencem ao tipo II, como a DNA girase ou topoisomerase II e a topoisomerase IV.

A DNA girase é a única enzima bacteriana que introduz superespirais negativos e retira superespirais positivos da molécula de DNA. A topoisomerase IV é responsável pela separação das fitas filhas de DNA após a divisão cromossômica (decatenação). DNA girase e topoisomerase IV (topoisomerases do tipo II) são os sítios alvos das quinolonas.

DNA girase é um tetrâmero que consiste em duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. Ambas as subunidades contêm uma região 4-hélice que liga a enzima ao DNA (Figura 4). A

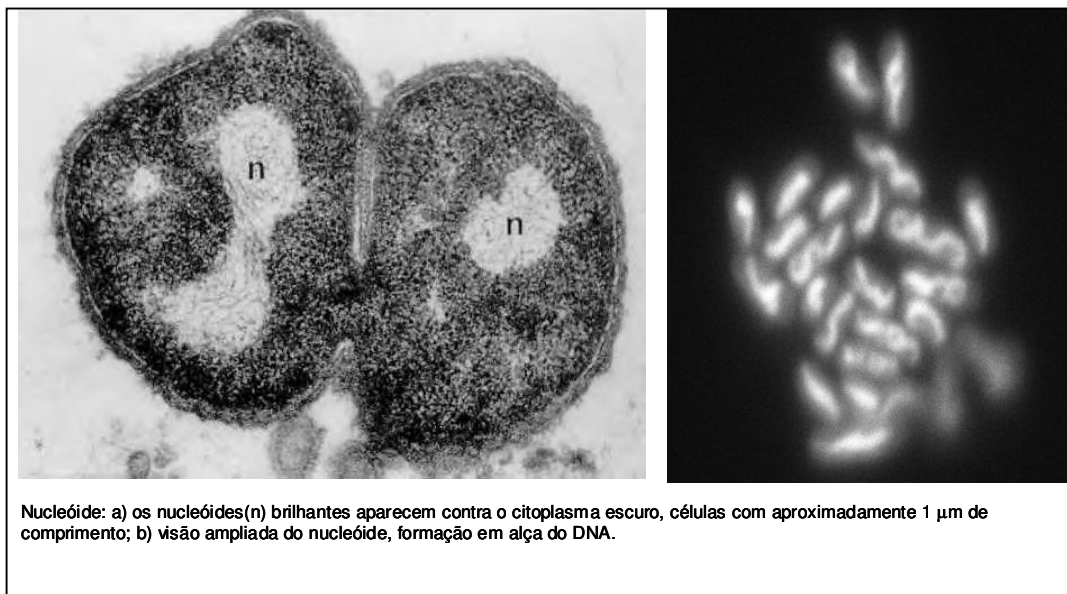
topoisomerase IV também possui duas subunidades, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, que são homólogos aos genes *gyrA* e *gyrB* (HOOPER, 2000).

As quinolonas ligam-se à DNA girase ou topoisomerase IV na presença de DNA, alterando a conformação das enzimas. Atuam inibindo a função dessas enzimas e ainda promovem um efeito tóxico para a célula por capturar uma ou ambas as enzimas do cromossomo bacteriano criando um complexo ternário, medicamento-enzima-DNA (Figura 5), no qual as fitas duplas rompidas do DNA são mantidas juntas pelas enzimas. As quinolonas se fixam através de pontes de hidrogênio, entre os grupos carbonila e carboxila dos anéis quinolônicos e as bases do DNA, sendo que os grupamentos adjacentes são unidos à mesma fita, orientados em sentidos opostos para evitar repulsão de cargas (DRLICA, 1999).

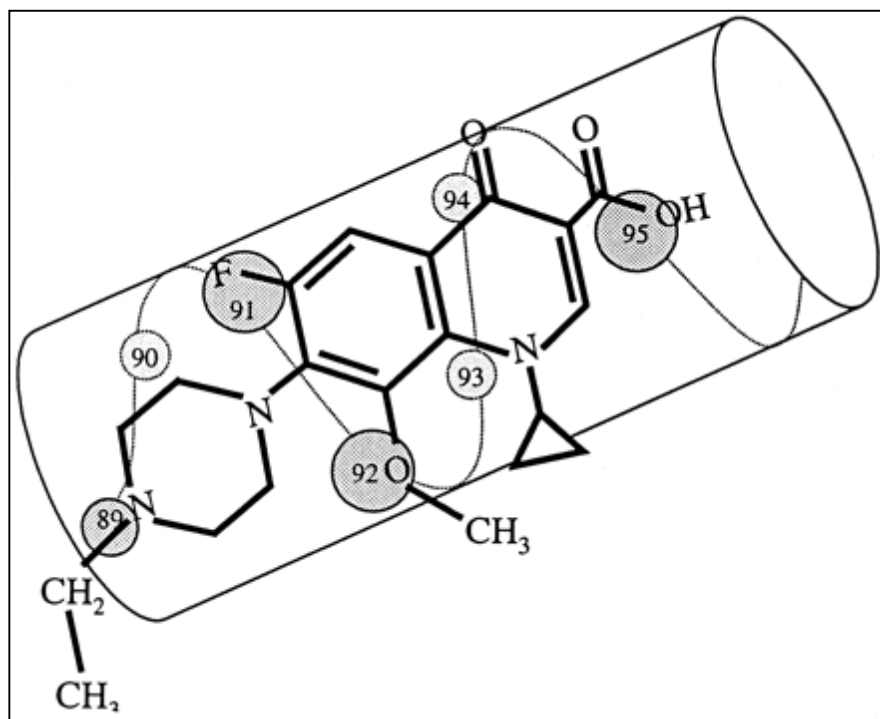
O bloqueio da replicação do DNA pode ocorrer por duas vias, a principal envolve a remoção do complexo quinolona-DNA Girase, liberando a dupla fita rompida de DNA. O DNA tem relaxadas suas espirais e passa a ocupar maior espaço que o contido nos limites do corpo bacteriano. Além disso, as extremidades livres do DNA induzem a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, a produção de exonucleases e degradação cromossomal (TAVARES, 1996; HOOPER, 1998).

A segunda via consiste na dissociação da enzima complexada ao DNA. Ocorre liberação das pontas de DNA ligadas às subunidades da enzima levando à morte celular. Esta via ocorre quando as células são tratadas com altas concentrações de quinolonas (HOOPER, 1998).

FIGURA 3 - NUCLEÓIDE E FORMAÇÃO EM ALÇA DO DNA BACTERIANO

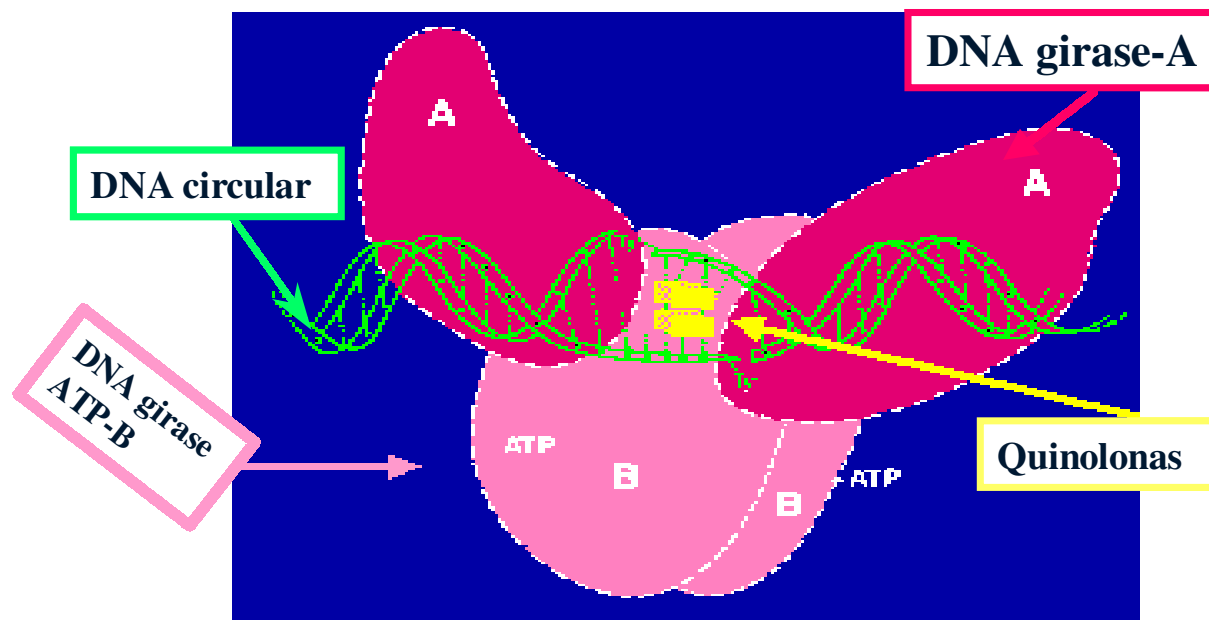


FONTE: Adaptado de ASM microbellibrary.org©Graham

FIGURA 4 - REGIÃO 4 α -HÉLICE DA DNA GIRASE

FONTE: SINDELAR et all, 2000

FIGURA 5 – COMPLEXO TERNÁRIO: DNA GIRASE-DNA-QUINOLONAS



FONTE: HOOPER, 2000.

A afinidade pelo sítio de ação depende do gênero da bactéria e da quinolona. Em bactérias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria gonorrhoeae*, o principal sítio de ação das quinolonas é a DNA girase, sendo a topoisomerase IV o sítio secundário. Em Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* os sítios são contrários (PAN, 1998).

Como essas enzimas apresentam diferentes funções, a resposta às quinolonas irá diferir de acordo com o principal alvo de ação de cada bactéria. Em adição, nem todas as bactérias possuem as duas enzimas, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* e *Treponema pallidum* possuem apenas DNA girase (HOOPER, 2001).

As quinolonas mais antigas, como a ciprofloxacina e a ofloxacina, apresentam excelente atividade contra a DNA girase de bactérias Gram negativas e contra as topoisomerase IV de bactérias Gram positivas. Sua atividade contra a DNA girase de Gram positivos e contra as topoisomerase IV de Gram negativos é relativamente fraca. Dessa maneira, as bactérias podem tornar-se resistentes à ciprofloxacina através de mutações pontuais nos gens que codificam a enzima para qual ela apresenta maior atividade, pois sua atuação na outra enzima (Girase de Gram positivos ou Topoisomerasas IV de Gram negativos) não será suficiente para inibir adequadamente a bactéria (DRLICA & ZHAO, 1997).

Por outro lado, as novas quinolonas apresentam excelente atividade contra ambas as enzimas, tanto em bactérias Gram negativas quanto Gram positivas. Essas características proporcionam não só maior potência como também tornam mais difícil o desenvolvimento de resistência, pois a bactéria terá que apresentar mutações nas duas enzimas, uma vez que a atuação em qualquer uma das enzimas será suficiente para inibir a bactéria (HOOPER, 1998).

A tabela 2 ilustra a afinidade pelo sítio alvo entre uma quinolona de 2ª geração (ciprofloxacina) e outra de 4ª geração (trovafloxacina).

TABELA 2 – ATIVIDADE DA TROVAFLOXACINA EM COMPARAÇÃO COM A CIPROFLOXACINA NOS DOIS PRINCIPAIS SÍTIOS DE AÇÃO DE DIFERENTES ESPÉCIES BACTERIANAS

BACTÉRIA	CIPROFLOXACINA		TROVAFLOXACINA	
	DNA Girase	Topo IV	DNA Girase	Topo IV
<i>E. coli</i>	****	*	****	****
<i>S. pneumoniae</i>	*	****	****	****
<i>S. aureus</i>				

FONTE: HOOPER, 1998

2.8 MECANISMO DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS

A resistência às fluorquinolonas apareceu num período muito curto após a introdução dessas drogas, o uso extensivo principalmente de ciprofloxacina e ofloxacina levou à seleção de cepas mutantes resistentes. Algumas bactérias como *S. aureus* e *P. aeruginosa*, uma única mutação já é suficiente para surgir resistência observável clinicamente. No caso de *S. aureus* e estafilococos coagulase negativos, cepas resistentes à meticilina desenvolveram resistência às fluorquinolonas mais rapidamente que as cepas meticilina-sensíveis (HOOPER, 2001).

Campylobacter jejuni, *Escherichia coli* e *Neisseria gonorrhoeae* desenvolvem resistência a esses fármacos por meio de múltiplos eventos mutacionais. Fatores epidemiológicos podem estar envolvidos, pois há uma nítida correlação entre o uso desses antibióticos em humanos e em aves domésticas. Esse mecanismo explica porque patógenos zoonóticos, como *Campylobacter jejuni*, têm aumentado a resistência por pressão seletiva em animais reservatórios dessas bactérias (HOOPER, 2001).

A presença de portadores fecais de *E. coli* resistente às quinolonas parece ser comum em alguns países. Na Espanha, adultos que nunca usaram esses medicamentos e crianças no primeiro ano de vida, para as quais eles são raramente prescritos, apresentavam cepas mutantes. Provavelmente, a aquisição foi feita via cadeia alimentar, uma vez que também foram isoladas *E. coli* resistentes em aves domésticas (HOOPER, 2001).

A propagação clonal pessoa-a-pessoa também é importante. Nos Estados Unidos têm ocorrido surtos de infecção por *Neisseria gonorrhoeae* resistente às fluorquinolonas (HOOPER, 2001).

Além dos fatores epidemiológicos, as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos antibióticos influenciam de forma marcante a atividade antimicrobiana *in vivo* e o desenvolvimento de resistência. O pico de concentração do nível plasmático em relação à concentração inibitória mínima (CIM), a área sob a curva de concentração (AUC) em relação a CIM e o tempo acima da CIM são os fatores mais importantes (FILE, 2001).

Parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos que se correlacionam com a eficácia podem ser dependentes da concentração (níveis plasmáticos mais elevados) ou dependentes do tempo (manutenção de níveis plasmáticos por um período mais prolongado). A eficácia das quinolonas é concentração dependente, determinada pela AUC ou pelo pico de concentração da droga no plasma (FILE, 2001).

O parâmetro primário para determinar a eficácia é a área sob a curva inibitória (AUIC), definida como AUC em 24 horas dividida pela CIM do patógeno, o que resulta em $AUIC = AUC/CIM$. Tem-se demonstrado, por exemplo, que para bacilos Gram negativos há melhor eficácia e menor possibilidade de desenvolver resistência quando os valores da AUIC estão acima de 100 e para *S. pneumoniae* quando estão entre 25 a 30 (WRIGHT et al, 2000).

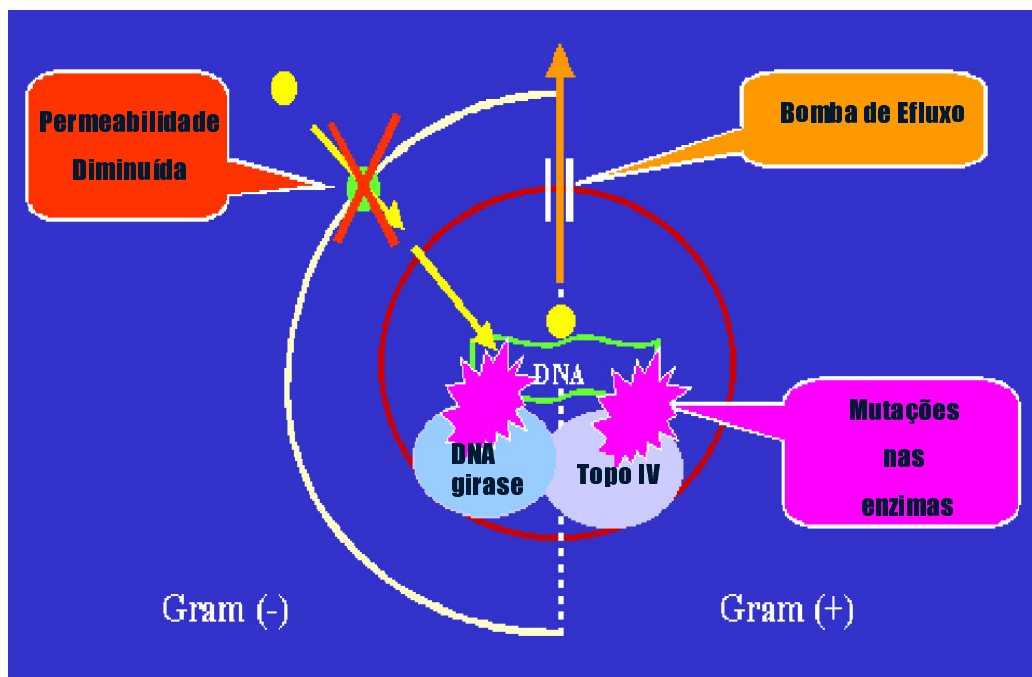
Calculando os valores da AUIC para *S. pneumoniae* no plasma e no soro para várias fluorquinolonas, há uma ampla variação nos resultados. Deve-se levar em consideração a característica individual de ligação com as proteínas plasmáticas, quando os agentes são comparados de acordo com os resultados séricos. Ciprofloxacina mostrou baixa eficácia contra pneumococo (AUIC de 13); levofloxacina (AUIC=36), sparfloxacina (AUIC=29) e grepafloxacina (AUIC=40) mostraram atividade “borderline”; moxifloxacina (AUIC=110), gatifloxacina (AUIC=112) e gemifloxacina (AUIC=88) mostraram a melhor atividade. Esses resultados indicam que as novas quinolonas são mais indicadas para prevenir o aparecimento de resistência aos pneumococos, por possuírem afinidade aumentada pelo sítio alvo (FILE, 2001).

A bactéria pode resistir à ação das quinolonas de diversas maneiras, dependendo do medicamento e do organismo. No caso dos agentes mais recentes, parece necessário mais de um mecanismo para o desenvolvimento de resistência clinicamente significativa.

O desenvolvimento de resistência bacteriana foi observado com o uso de ácido nalidíxico e com menos frequência com as quinolonas mais recentes. Entretanto, a exposição a concentrações crescentes destes fármacos resulta em cepas altamente resistentes de muitas espécies, podendo existir resistência cruzada a outras quinolonas (SADER, 1994).

As bactérias podem tornar-se resistentes às quinolonas principalmente por meio de mutações nos genes *gyr* e *par*, proporcionando um alvo insensível (Figura 6). Podem ainda apresentar diminuição da incorporação do fármaco, tanto por redução da permeabilidade das porinas quanto por aumento do sistema de efluxo ativo (HOOPER, 2001). Outro mecanismo de resistência relatado é a aquisição do gene *qnr*, mediado pelo plasmídeo pMG252 (TRAN & JACOBY, 2002). Até o momento, não foram identificadas enzimas que degradem especificamente as quinolonas.

FIGURA 6 – PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS



FONTE: SHEN, 1994.

2.8.1 Mutações nos genes que codificam para DNA Girase e Topoisomerase IV

Como foi apresentado anteriormente, as quinolonas atuam ligando-se às topoisomerasas II e IV. Essas enzimas são homólogas, constituídas de quatro subunidades cada. A topoisomerase II é composta por duas subunidades GyrA e duas subunidades GyrB, enquanto a topoisomerase IV é constituída por duas subunidades ParC e duas ParE. As subunidades GyrA e ParC constituem o principal alvo de ação das quinolonas. Portanto, mutações nos genes que codificam essas subunidades irão acarretar a diminuição da afinidade da bactéria pelas quinolonas, e conseqüentemente, sua resistência (HOOPER, 2000).

Em geral, a resistência às quinolonas, associada a mutações nas topoisomerasas, ocorre de modo escalonado e cumulativo, ou seja, mutações simples no sítio principal de ação da droga são associadas a moderados graus de resistência, enquanto mutações adicionais no sítio primário e/ou secundário levam ao alto grau de resistência (HOOPER, 2000).

O alto grau de resistência às quinolonas surge de maneira gradual após sucessivas mutações nos seus sítios de ação (step wise mutations). Geralmente, a primeira mutação simples ocorre no principal alvo de ação, a segunda mutação simples no alvo secundário e a terceira mutação novamente no sítio principal de ação. A cada mutação há um aumento na CIM para as fluorquinolonas, o que torna importante o reconhecimento de amostras com baixos graus de resistência (DRLICA, 1999).

Em *E. coli*, a maioria das mutações ocorre em uma pequena porção do principal alvo de ação das quinolonas, o gene *gyrA*. Essa parte do gene é denominada “Região Determinante de Resistência às Quinolonas” (QRDR) e codifica os aminoácidos situados entre as posições 67 e 106 (YOSHIDA, 1990).

A substituição mais comumente observada é a da serina pela leucina ou triptofano na posição 83, podendo resultar em um aumento da concentração inibitória mínima para ciprofloxacina superior a 40 diluições. Elevações ainda maiores são alcançadas quando ocorre uma segunda mutação, levando à substituição do ácido aspártico na posição 87. Mutações na região determinante de resistência às quinolonas do gene *parC*, com substituições do resíduo serina na posição 80 e do ácido glutâmico na posição 84, também têm sido observadas em

amostras com alto grau de resistência às quinolonas. Essas mutações, porém, sempre são acompanhadas de mutações duplas no gene *gyrA* (KUMAGAI, 1996).

Raramente, a resistência às fluorquinolonas em *E. coli* tem sido associada a mutações nos genes *gyrB* e *parE*. Ainda não se compreende como mutações nestes genes podem afetar a resistência às quinolonas nesta bactéria (HOOPER, 2001).

Em recente estudo realizado por GALES (2001), todas as amostras de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina apresentavam duas mutações no gene *gyrA* que levaram a substituições nas posições 83 e 87, e mutações simples no gene *parC*. Tais amostras demonstraram CIMs elevadas para ciprofloxacina, sendo ainda resistentes a outras quinolonas testadas, tais como gatifloxacina, trovafloxacina e ofloxacina. As mutações encontradas por este estudo são semelhantes às aquelas referidas por outros autores (HEISIG, 1996; KUMAGAI, 1996).

Embora a única amostra de *E. coli* com uma mutação simples nos genes *gyrA* e *parC* tenha sido também classificada como resistente à ciprofloxacina, a CIM para este antimicrobiano foi pelo menos quatro vezes menor que aquela demonstrada pelos isolados com duas mutações no gene *gyrA*. Além disso, essa amostra foi classificada como sensível à gatifloxacina (GALES, 2001).

Esse fato sugere que múltiplas mutações são necessárias para o surgimento de alto grau de resistência às quinolonas e que as metoxi-quinolonas, como a gatifloxacina e moxifloxacina, apresentam maior atividade contra bactérias com mutações simples, como relatado previamente (DRLICA, 1999; HOOPER, 1998; BRISSE, 1999a; HOOPER, 2001).

Nenhuma mutação foi detectada nos genes *gyrA* e *parC* entre as amostras de *E. coli* categorizadas como sensíveis à ciprofloxacina com CIMs $< \text{ou} = 0,015 \mu\text{g/mL}$. Por outro lado, mutações simples no gene *gyrA* foram detectadas nas amostras sensíveis à ciprofloxacina com CIMs entre 0,12 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$. A mutação mais comum levou à substituição da serina pela leucina na posição 83. Não se desenvolveram mutações simples no gene *parC* nos isolados sensíveis à ciprofloxacina com CIMs entre 0,12 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (GALES, 2001).

Nas enterobactérias, o mecanismo mais importante de resistência às quinolonas é a alteração na subunidade GyrA da DNA girase, seguida de mutações

em ParC, subunidade da topoisomerase IV (BRISSE, 1999b). As principais trocas de aminoácidos para este grupo podem ser observadas na tabelas 3 e 4.

Em *Klebsiella pneumoniae* ciprofloxacina resistente demonstrou-se a mudança do aminoácido serina 83 pela tirosina, fenilalanina ou isoleucina. Em *Klebsiella* spp, uma alteração única em Ser 83 da subunidade GyrA foi associada com uma CIM da ciprofloxacina de 2 µg/mL. Mudanças adicionais nos aminoácidos na posição 87 (ácido aspártico) em GyrA ou na posição 80 (serina) em ParC geralmente aumentam a CIM. Isolados sem mutações em GyrA e ParC demonstraram CIM para ciprofloxacina de 0,06 µg/mL (BRISSE, 1999).

Klebsiella oxytoca mostrou a mudança na posição 83 de triptofano para isoleucina. Todos os isolados de *Enterobacter cloacae* mostraram uma mudança de serina 83 para fenilalanina ou tirosina, e isolados de *Enterobacter aerogenes* uma mudança de serina 83 para isoleucina ou tirosina (BRISSE, 1999).

Para *Pseudomonas aeruginosa* as principais alterações na QRDR ocorrem no gene *gyrA* da DNA girase, como pode ser observado na tabela 5.

Em *Campylobacter jejuni*, a mutação no gene *gyrA* determina resistência à ciprofloxacina. As mutações observadas ocorreram na posição 86 com troca do aminoácido tirosina por isoleucina (ZIRNSTEIN, 1999).

Em relação às bactérias anaeróbicas como *Bacteriodes fragilis*, poucos dados foram publicados, mas a alteração de efluxo e a alteração da região determinante de resistência do gene *gyrA* podem estar envolvidas no mecanismo de resistência às quinolonas (PETERSON, 1999).

Mutações em DNA girase e topoisomerase IV também conferem resistência às quinolonas em bactérias atípicas como *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. As quinolonas de quarta geração são mais eficazes contra estas bactérias, uma vez que estas requerem duas ou mais mutações em sítios diferentes para se tornarem resistentes a esta nova classe (BEBEAR, 2000).

TABELA 3 - MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM *Klebsiella pneumoniae*

DNA GIRASE		TOPOISOMERASE IV	
Gyr A	Gyr B	ParC	ParE
Ser 83 *	* Tyr		
Ser83 *	* Phe		
Ser83 *	* Phe		
Asp87 *	* Tyr		
Ser83 *	* Ile	Ser80 *	* Ile
Ser83 *	* Phe	Ser80 *	* Ile

FONTE: BRISSE,1999.

TABELA 4 - MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM *Escherichia coli*

DNA GIRASE		TOPOISOMERASE IV	
Gyr A	Gyr B	Par C	Par E
Ala 67*	* Ser	Ser 426*	* Asn
Ser 80*	* Arg	Gly 78*	* Asp
Gly 81*	* Asp	Gly 78*	* Cys
Gly 81*	* Cys	Ser 80*	* Ile
Asp 82*	* Gly	Glu 84*	*Gly
Ser 83*	* Ala	Glu 84	Lys
Ser 83*	* Leu		
Ser 83*	* Trp		
Ala 84*	* Pro		
Aps 87*	* Asn		
Asp 87*	* Gly		
Gln 106*	* Arg		
Gln 106*	*His		

FONTE: PAN, 1998; HEISIG, 1996.

TABELA 5 - MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM *Pseudomonas aeruginosa*

DNA GIRASE		TOPOISOMERASE IV	
Gyr A	Gyr B	Par C	Par E
Thr 83	Ile		
Asp 87 *	* Asn		
Asp 87 *	* Gly		
Asp 87 *	* Tyr		
Asn 116 *	* Tyr		

FONTE: KOHLER, 1997.

Em *Staphylococcus aureus*, estudos genéticos mostram que uma única mutação em *grlA* (que equivale ao gene *parC* em *Escherichia coli*) é capaz de causar resistência às quinolonas, fato que não se manifesta em uma única mutação em *gyrA* (Tabela 6). Portanto, ao contrário do que ocorre em *Escherichia coli*, o primeiro alvo de ação é a topoisomerase IV (MORRISSEY, 1999).

O uso intenso de fluorquinolonas em ambiente hospitalar é um elemento de risco para o aumento de casos de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA), onde possivelmente um dos fatores envolvidos seja a seleção de MRSA pela exposição dessas bactérias a concentrações subinibitórias das fluorquinolonas, em especial a ciprofloxacina (SADER, 1994).

Resistência às fluorquinolonas é considerada alta entre amostras de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) (JONES, 1999).

Em *Streptococcus pneumoniae*, estudos genéticos têm mostrado que a primeira mutação ocorre na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) nos genes *parC* ou *parE* da topoisomerase IV, observada na tabela 7 (MORRISSEY, 1999).

VARON et al. (1999) encontraram três tipos de resistência em *Streptococcus pneumoniae*. O primeiro nível de resistência foi obtido quando um único alvo, ParC ou GyrA, dependendo da fluorquinolona, foi modificado. O segundo nível, quando uma segunda mutação foi adicionada no outro alvo, ParC ou GyrA. O aumento da resistência se completa com uma dupla mutação em ambas as enzimas GyrA e ParC.

BRISSE (1999b), analisando amostras de *Enterococcus faecium* com alterações em genes *parC* e *gyrA* em combinação com outros mecanismos de resistência restringiram severamente a atividade *in vitro* de nove quinolonas testadas.

TABELA 6 - MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM *Staphylococcus aureus*

DNA GIRASE				TOPOISOMERASE IV			
Gyr A		Gyr B		GrlA		GrlB	
Asp 73 *	* Gly	Asp 437 *	* Asn	Ser 80 *	* Phe	Asp 432 *	* Asp
Ser 84 *	* Ala	Arg 458 *	* Gln	Ser 80 *	* Try	Asn 470 *	* Asp
Ser 84 *	*Leu			Ser 81 *	* Pro		
Ser 85 *	* Pro			Glu 84 *	* Lys		
Glu 88 *	* Lys			Ala 116 *	* Glu		
Asp 82 *	* Gly			Ala 116 *	* Pro		

FONTE: PAN, 1998.

TABELA 7 - MUTAÇÕES NO SÍTIO DE AÇÃO EM *Streptococcus pneumoniae*

DNA GIRASE				TOPOISOMERASE IV			
Gyr A		Gyr B		Par C		Par E	
Ser 81 *	* Phe	Asp 435 *	* Asn	Ser 79 *	* Phe	Asp 435 *	* Asn
Ser 83 *	* Phe	Glu 474 *	* Lys	Ser 79 *	* Tyr	Pro 454 *	* Ser
Ser 83 *	* Tyr			Ser 80 *	* Pro		
Ser 84 *	* Phe			Asp 83 *	* Ala		
	* Tyr			Asp 83 *	* Gly		
Ser 84 *							
Glu 85 *	* Lys			Asp 83 *	* His		
Glu 87 *	* Gln			Asp 83 *	* Tyr		
Glu 87 *	* Lys			Ala 84 *	* Thr		
Trp 93 *	* Arg			Arg 95 *	* Lys		
				Lys 137 *	* Asn		

FONTE: PAN, 1998.

2.8.2 Bombas de Efluxo

Resistência causada por redução da acumulação de quinolonas tem sido observada com o aumento da expressão de bombas de efluxo, encontradas na membrana citoplasmática de bactérias Gram positivas e Gram negativas (FILE, 2001).

Quando quinolonas são utilizadas como substrato destas bombas, há uma redução da concentração intracelular delas. Este sistema tem sido reportado em várias bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Estas bombas estão presentes em muitas bactérias, e eventualmente associadas a um aumento de 2 a 4 vezes na CIM do antimicrobiano (HOOPER, 2001).

O sistema de efluxo tem o papel de remover toxinas do citoplasma ou da membrana citoplasmática e, geralmente, o substrato natural deste sistema é desconhecido. Genes como *nor*, *mex* e *nfx* têm sido estudados. Por mutações em tais genes, estas proteínas de efluxo são expressas em grande quantidade, ocorrendo a resistência. O risco de aquisição de resistência pode ser reduzido, evitando quinolonas que são bons substratos de bomba de efluxo, como a norfloxacin (HOOPER, 2001).

As bombas de efluxo nas bactérias Gram negativas também podem estar ligadas a outras proteínas capazes de facilitar a extrusão da droga através do periplasma e da membrana externa (HOOPER, 2000). Nestas bactérias, o sistema de efluxo possui, tipicamente, três componentes: uma bomba de efluxo localizada na membrana citoplasmática, uma proteína de membrana externa e uma proteína de fusão da membrana. Esta tem a função de ligar a bomba de efluxo à proteína da membrana externa. Em amostras de *Escherichia coli*, os componentes do sistema de efluxo AcrAB são: a bomba AcrB, a proteína de fusão da membrana AcrA e a proteína de membrana externa TolC. Os genes que fazem parte do sistema MAR, e que irão regular o sistema de efluxo AcrAB, são *marA*, *acrR*, *robA* e *soxS*. Mutações cromossômicas nesses genes levam à superexpressão do sistema e, conseqüentemente, à resistência às fluorquinolonas (HOOPER, 2001).

Os componentes das bombas de efluxo variam conforme o gênero e podem ser vistos na tabela (8) a seguir.

TABELA 8 - COMPONENTES DO SISTEMA DE EFLUXO DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS

BACTÉRIA	COMPONENTES DA BOMBA DE EFLUXO			
	Bomba	Proteína de fusão de membrana	Proteína de membrana externa	Gene regulatório ou mutação
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mex B	Mex A	Opr M	<i>mex R</i>
	Mex D	Mex C	Opr J	<i>mfz B</i>
	Mex F	Mex E	Opr N	<i>mex T</i>
	mex Y	Mex X	Opr M	<i>mex Z</i>
<i>Escherichia coli</i>	Acr B	Acr A	Tol C	<i>acr B, mar A, rob A, sox S</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nor A	--	--	<i>flq B</i> promotor de mutação, <i>arl RS</i>
<i>S. pneumoniae</i>	Pmr A	--	--	?

FONTE: HOOPER, 2001.

Nas bactérias Gram negativas, as bombas de efluxo localizadas na membrana interna podem agir concomitantemente com proteínas da membrana externa, chamadas de porinas. Estas, por sua vez, podem apresentar mudanças na quantidade, tamanho, estrutura e função, o que reduz a difusão através dos canais protéicos da membrana externa para produzir uma resistência de baixo nível (FILE, 2001).

2.8.3 Resistência Mediada por Plasmídios

Resistência às quinolonas pode ser transferida de bactéria para bactéria por meio de plasmídeos (MARTINEZ, 1998).

Resistência às quinolonas codificada pelo gene *qnr* e mediada pelo plasmídeo *pMG252* foi descoberta em um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* (1994) nos EUA. O gene codifica para uma proteína, pertencente a uma família de proteínas pentapeptídeos repetidos, que protege a DNA girase da inibição pelas

quinolonas. Esta proteína possui 218 aminoácidos com domínios repetidos de 11 e 28 cópias, uma atrás da outra, separadas por uma única glicina e com uma sequência consenso de A/C/D/NL/FXX (TRAN & JACOBY, 2002).

A prevalência do gene *qnr* tem sido investigada por PCR em mais de 350 bactérias Gram negativas de 14 gêneros, provenientes de 18 países e de 24 estados dos EUA. Neste estudo, a resistência às quinolonas mediadas por plasmídeo foi rara, somente 6 das 350 amostras. Das 6 positivas, 5 eram *Klebsiella* e 1 *E. coli* (JACOBY et al, 2003).

2.9 PREVENÇÃO DA SELEÇÃO DE MUTANTES

Várias estratégias têm sido usadas para diminuir o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos. Em relação à resistência bacteriana às quinolonas mediada por mutações, surgiu uma estratégia nova baseada na concentração do antimicrobiano capaz de inibir o surgimento de mutantes resistentes. Esse índice é chamado de “Mutant Prevent Concentration” (MPC) e seu valor varia entre as quinolonas para diferentes microrganismos (ZHAO & DRLICA, 2001).

Conceitualmente, a seleção de mutantes resistentes ocorre dentro de uma variação de concentração específica da droga, chamada janela de seleção de mutantes. O limite inferior da janela é a menor concentração da droga que inibe a maioria das cepas sensíveis à droga. Esta concentração pode ser aproximada da CIM₅₀. O limite superior da janela é a concentração que inibe o crescimento da maioria dos resistentes, com uma mutação. Acima desse limite, o crescimento celular requer duas ou mais mutações de resistência (Figura 7).

Devido ao fato de raramente ocorrerem mutações múltiplas, poucos mutantes serão seletivamente amplificados quando a concentração da droga exceder o limite superior. Por exemplo, com fluorquinolonas, a frequência de mutação para resistência é menor que um numa população de 10^7 UFC/mL. Já a possibilidade de encontrar uma célula com duas mutações que conferem resistência às fluorquinolonas é de uma célula em uma população maior do que 10^{14} UFC/mL. Em um caso clínico típico, a população bacteriana pode chegar até 10^{10} UFC/mL células

no sítio de infecção, mas a possibilidade de atingir 10^{14} UFC/mL é remota. Então a resistência raramente ocorrerá quando a concentração da droga está acima do limite superior da janela de seleção de mutantes, que define a MPC – “Mutant Prevent Concentration” (Drlica, 2001).

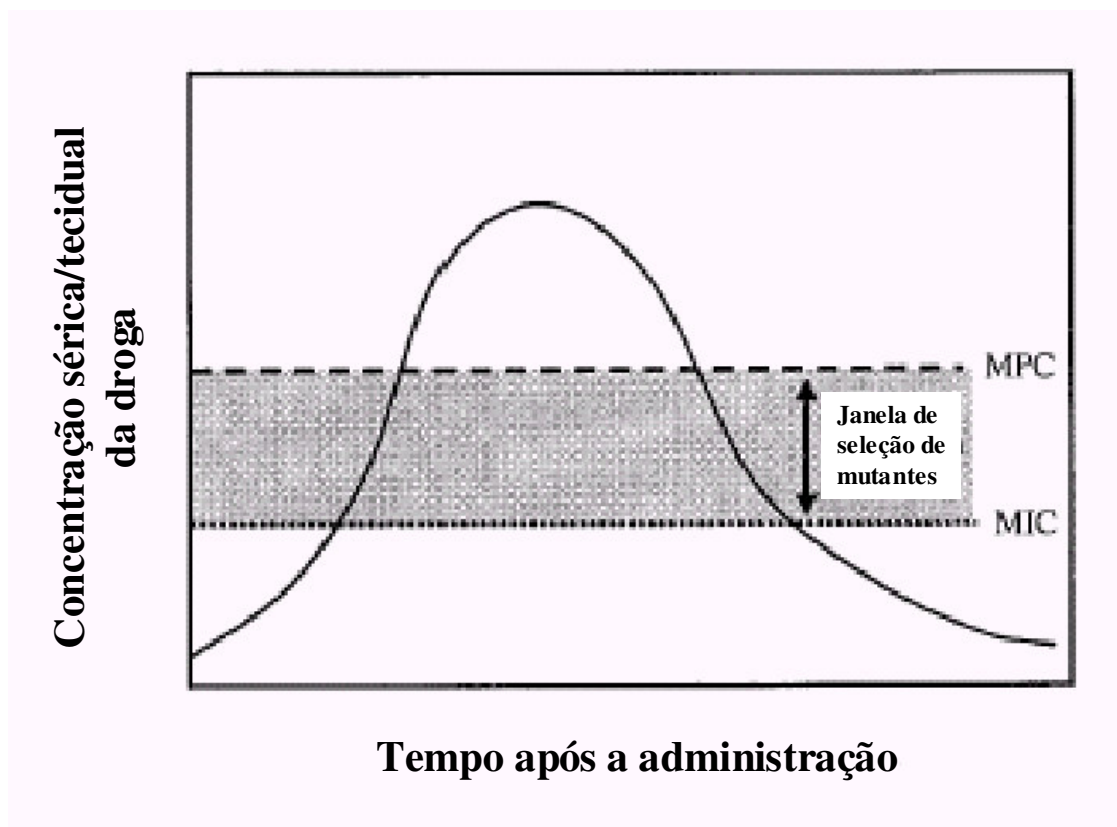
A técnica para a detecção da MPC é semelhante ao método de ágar diluição. A bactéria é inoculada em placas de MH ágar com diferentes concentrações do antibiótico testado. O inóculo bacteriano, no entanto, é extremamente alto. Nas técnicas utilizadas para determinar a sensibilidade, o inóculo é da ordem de 10^5 - 10^6 UFC/mL, enquanto para determinar a MPC é de 10^{10} UFC/mL.

A resistência aos antimicrobianos está emergindo em uma ampla variedade de patógenos adquiridos na comunidade e no hospital. Quando a resistência multidroga começou a aparecer, principalmente em bacilos Gram negativos entéricos, foi mediada em sua grande maioria por plasmídeos. O papel das mutações na gênese da resistência bacteriana acabou sendo subestimado. Contudo, para alguns microrganismos como *M. tuberculosis*, este mecanismo ocupa o principal papel na diminuição da sensibilidade à rifampicina, etambutol e fluorquinolonas. Similarmente, resistência às fluorquinolonas em *N. gonorrhoeae*, *S. pneumoniae* e espécies de *Salmonella* freqüentemente resultam de mutações nos *loci gyrA*, *gyrB* e *parC*. As mutações podem ainda préexistir em genes transferíveis de resistência, apresentando uma função diferente por aumentar ou expandir o espectro de resistência (TENOVER, 2001).

Alguns fatores contribuíram na emergência da resistência, como as mutações em genes de resistência, a troca de informação genética no qual genes de resistência são transmitidos para o hospedeiro, a pressão seletiva exercida pelo antibiótico no hospital e na comunidade e a incapacidade de alguns laboratórios em testar métodos que detectem fenótipos de resistência emergentes (TENOVER, 2001).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno ecológico originado da resposta da bactéria ao amplo uso de antibióticos e da presença deste no ambiente, representando um dilema terapêutico mundial. E a concentração que previne o surgimento de mutantes é um índice microbiológico que vem sendo utilizado para minimizar o surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos.

FIGURA 7 – JANELA DE SELEÇÃO DE MUTANTES



FONTE: ZHAO & DRLICA, 2001

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso do ácido nalidíxico como marcador preditivo da resistência às outras quinolonas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o perfil de sensibilidade ao ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacina e gatifloxacina de *Escherichia coli* isoladas de urocultura.
- b) Comparar os métodos de difusão em ágar e diluição em ágar para detecção de resistência quali e quantitativa às quinolonas.
- c) Estudar o principal mecanismo de resistência por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento das regiões determinantes de resistência às quinolonas (QRDR) dos genes *gyrA* e *parC*.
- d) Avaliar o perfil de sensibilidade de *Escherichia coli* frente à nitrofurantoína e sulfametoxazol/trimetoprim.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram coletadas 385 amostras sucessivas de *Escherichia coli*, isoladas de pacientes com suspeita de infecção urinária, atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, durante o período de seis meses, de maio a novembro de 2002. Foi incluída apenas uma amostra por paciente, com desenvolvimento bacteriano único e contagem de colônias igual ou superior a 10^4 UFC/mL (CLARRIDGE et al, 1998). Todas as amostras foram correntemente submetidas ao processo de identificação e teste de SENSIBILIDADE aos antimicrobianos (TSA) do sistema automatizado WalkAway® (Dade Behring™).

Dados referentes ao paciente, como gênero, idade, unidade clínica, foram obtidos do mapa de trabalho do setor de bacteriologia com informações fornecidas pelo médico requisitante. Além disso, o resultado do (TSA) pelo sistema automatizado também foi registrado.

4.1.1 Estocagem das Amostras Bacterianas

Escherichia coli isoladas primariamente em meios seletivos foram repicadas em meio não seletivo, ágar tríptico de soja, e incubadas a 35° C por 18-24 horas. Na seqüência, foram armazenadas em frascos estéreis contendo caldo tríptico de soja /Glicerol 15% (v/v), em freezer a - 70 ° C (JONES et al, 1994).

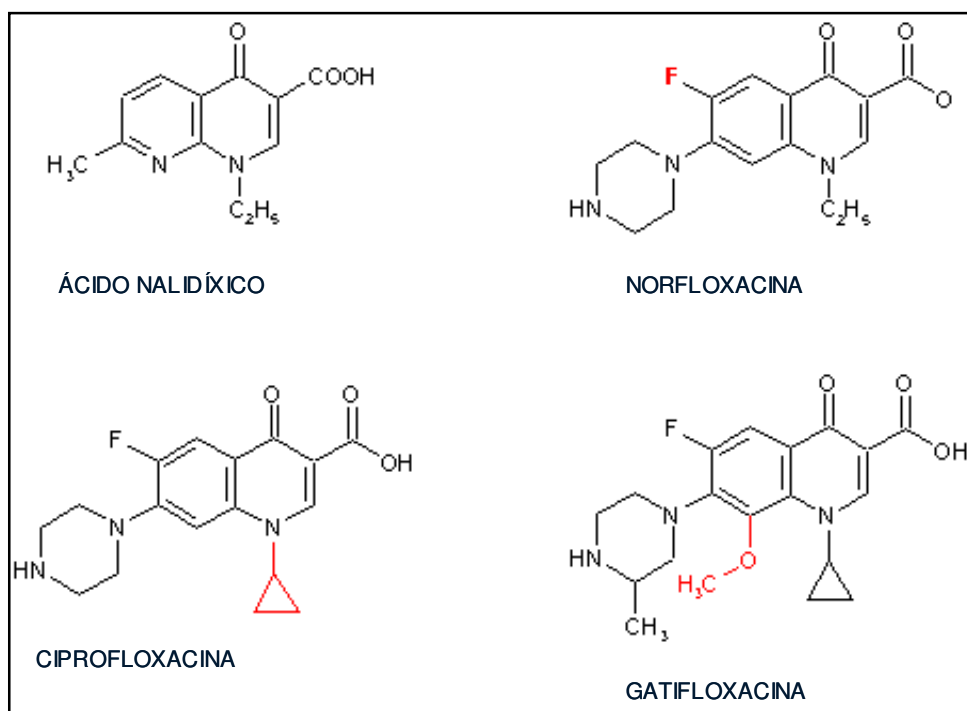
4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS POR DISCO DIFUSÃO EM ÁGAR

O teste de disco difusão em ágar (DD) consiste no cultivo da bactéria sob a qual deposita-se disco de papel impregnado com o antibiótico numa concentração fixa.

Foi determinado o padrão de sensibilidade a quatro quinolonas com ação em trato urinário, representando as diferentes gerações de quinolonas utilizadas no Brasil (Figura 8). *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade dos discos e do ágar Mueller-Hinton (MH). Placas inoculadas com a bactéria, sem os discos dos antimicrobianos, foram utilizadas para monitorar o crescimento bacteriano no meio. Os discos utilizados foram: ácido nalidíxico (NAL) 30µg, norfloxacin (NOR) 10µg e ciprofloxacina (CIP) 5µg, todos adquiridos comercialmente da empresa Newprov®. Gatifloxacina (GTF) 5µg foi doada pelo laboratório Bristol Myers Squibb®. O teste foi realizado conforme as normas do documento M2-A7 (NCCLS, 2000), sumarizado abaixo.

O inóculo foi preparado subcultivando as amostras em Ágar Trípico de Soja duas vezes antes do teste. Na sequência, transferiu-se 3 a 5 colônias isoladas de morfologia similar para um tubo contendo 4 a 5 mL de salina estéril. A turvação do inóculo foi comparada com a turvação do tubo 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) com auxílio de aparelho fotométrico, em absorbância de 625 nm. O limite de leitura aceitável variou entre 0,08 e 0,10; quando o inóculo inicial não ficou dentro do limite aceitável, a turbidez foi ajustada com mais bactéria ou mais salina estéril conforme a necessidade. As placas de ágar Mueller-Hinton (MH) foram inoculadas com a suspensão bacteriana por meio de swab impregnado, de modo a cobrir homogeneamente toda a superfície da placa. Os discos foram colocados manualmente sobre a superfície do ágar com auxílio de uma pinça estéril, a cerca de 24 mm um do outro e a 15 mm da parede da placa. Após a secagem, por período máximo de 15 minutos, as placas foram incubadas a 35 °C por 16 a 24 horas. Após a incubação foi realizada a medição do diâmetro do halo de inibição. Os resultados foram interpretados conforme os parâmetros da tabela 2A, do documento M100-S12 (NCCLS, 2002).

FIGURA 8 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUINOLONAS UTILIZADAS



4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) PELO MÉTODO DE ÁGAR-DILUIÇÃO

No intuito de avaliar a potência e atividade de NAL, NOR, CIP e GTF frente às amostras testadas, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM). Foram testados também nitrofurantoína (NIT) e sulfametoxazol/trimetoprim (SUT), por tratarem-se de opções terapêuticas para infecções do trato urinário.

4.3.1 Preparo das soluções de antibióticos

Ácido nalidíxico, norfloxacin e nitrofurantoína foram adquiridos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich®. SUT, da mesma empresa, foi doado pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), CIP foi adquirida da empresa ICN Biomedicals®. A gatifloxacin foi usada na forma medicamentosa (solução injetável na concentração de 4mg em 200 mL), doada pelo laboratório Bristol Myers Squibb®, devido à falta de disponibilidade do sal puro.

Foram testadas as concentrações fornecidas pela literatura (NCCLS), entre as quais encontram-se os pontos de corte (breakpoints) para classificação das amostras nas categorias sensível (S), resistente (R) e intermediário (I). A amostra era composta de *E. coli* sensíveis e resistentes às quinolonas, inicialmente classificadas pelo teste de difusão em ágar. Com o objetivo de diminuir os custos, foram utilizados dois esquemas de diluições conforme as concentrações na tabela 9.

TABELA 9 – CRITÉRIOS DE INTERPRETAÇÃO DE SENSIBILIDADE SEGUNDO O NCCLS E CONCENTRAÇÕES DOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS PARA AMOSTRAS DE *E. coli*

ANTIBIÓTICO	PONTO DE CORTE ($\mu\text{g/mL}$)		CONCENTRAÇÕES TESTADAS ($\mu\text{g/mL}$)	
	S	R	SENSÍVEIS	RESISTENTES
NAL	≤ 16	≥ 32	0,5-16	1-512
NOR	≤ 4	≥ 16	0,015-8	2-256
CIPRO	≤ 1	≥ 4	0,015-8	0,5-64
GATI	≤ 2	≥ 8	0,015-8	0,5-64
NITRO	≤ 32	≥ 128	0,5-256	0,5-256
SUT	$\leq 2/38$	$\geq 4/76$	0,03/06-16/304	0,03/06-16/304

A concentração da solução estoque (SE) foi calculada a partir da maior concentração testada para cada antimicrobiano, do volume de MH ágar utilizado nas placas e do volume final da SE. A quantidade em mg do antimicrobiano necessária para preparar as soluções foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Vol. do Solvente (mL)} \times \text{Conc. da Solução Estoque } (\mu\text{m/mL})}{\text{Potência do antibiótico } (\mu\text{g/mL})}$$

A concentração da solução estoque utilizada foi de 51200 $\mu\text{g/mL}$ para o NAL e NOR, de 6400 $\mu\text{g/mL}$ para a CIP e NIT, de 1600 $\mu\text{g/mL}$ para a GTF e 15200/800 $\mu\text{g/mL}$ para sulfametoxazol/trimetoprim.

O solvente utilizado para NAL, NOR e Sulfametoxazol foi NaOH 0,1 M/L, ácido láctico para Trimetoprim e água ultrapura para CIP. Gatifloxacina já estava na forma solúvel (solução injetável). Água ultrapura foi usada como diluente para esses antimicrobianos. Para Nitrofurantoína foi usado dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) como solvente e diluente, neste caso foi incluído uma placa controle a mais com MH ágar e DMSO, na mesma proporção dos antimicrobianos, para o controle de eventual efeito inibitório do DMSO.

As soluções de antimicrobianos foram esterilizadas por membrana filtrante de 0,22 μ de diâmetro (Millipore®), divididas em alíquotas e estocadas a 4° C, – 20° C ou – 70° C, conforme indicado.

4.3.2 Preparo das placas de Mueller-Hinton ágar com antimicrobiano

Foram realizadas diluições seriadas a partir da solução estoque (SE), com água ultrapura e DMSO para NIT. Diluiu-se a SE até a maior concentração a ser testada, as seguintes foram obtidas com diluição 1:2 até alcançar a menor concentração desejada – ver exemplo da diluição do NAL na Figura 9.

O ágar Mueller-Hinton foi preparado com os cuidados necessários e conforme instruções do fabricante. Foram distribuídas alíquotas em frascos de Castañeda estéreis. O volume distribuído em cada frasco foi de 48 mL para Sulfametoxazol/Trimetoprim e 49 mL para os demais antimicrobianos. Após resfriar em banho-maria até 48-50° C, foi adicionada a solução diluída do antimicrobiano, 2 mL para SUT (um mL de sulfametoxazol e um mL de trimetoprim) e 1 mL para os outros antibióticos, totalizando 50 mL, volume necessário para atingir a espessura preconizada de 4-5 mm do ágar. Após a homogeneização, o meio foi distribuído em placas estéreis descartáveis. As placas foram, então, refrigeradas e utilizadas até 48 horas após o preparo.

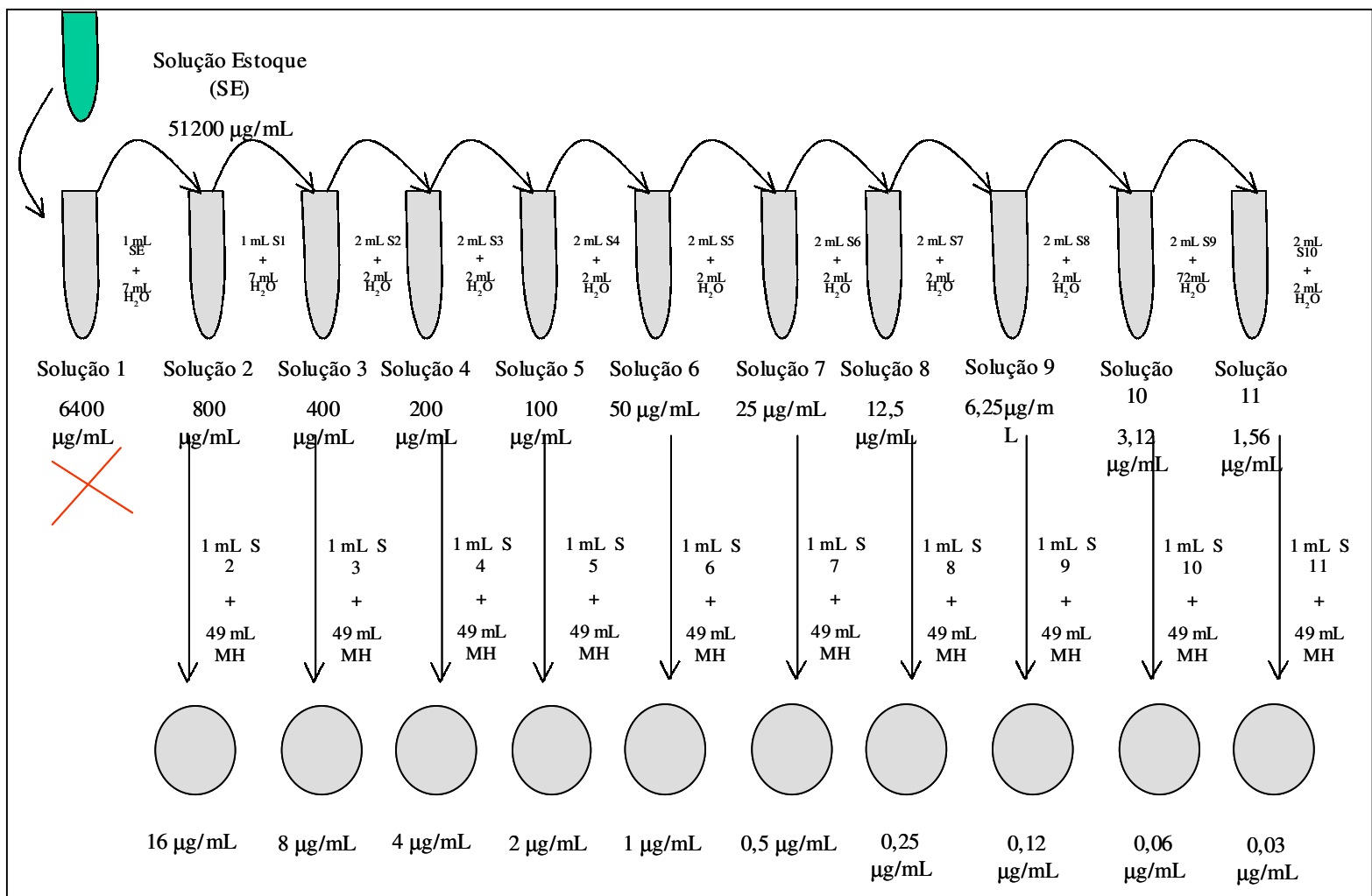


FIGURA 9 – EXEMPLO DE DILUIÇÃO SERIADA DA SOLUÇÃO ESTOQUE DO ÁCIDO NALIDÍXICO

4.3.3 Procedimento técnico do teste de agar-diluição

O inóculo bacteriano foi preparado de forma semelhante ao utilizado para o TSA por DD (ver ítem 4.2). Na seqüência, realizou-se a diluição do inóculo pois a concentração final por “spot” de 5-8 mm deve ser de 10^4 . Para obter esta concentração, o inóculo inicial foi diluído 1:10 em solução salina estéril, obtendo a concentração de 10^7 UFC/mL. Após a inoculação no MH ágar, os “spots” ficaram com a concentração de cerca de 10^4 , pois os inoculadores depositam entre 1-2 μ L da amostra sobre a superfície do ágar (Figura 10).

Foram distribuídas alíquotas de 100 μ L do inóculo diluído em placas tipo ELISA de 96 poços, para um replicador Steer com 96 pinos. As amostras foram inoculadas inicialmente em uma placa controle sem antibiótico. Na seqüência, as placas foram inoculadas partindo da placa de menor concentração do antimicrobiano (Figura 11). No final, foi inoculada outra placa controle sem antimicrobiano, para avaliar a eventual contaminação e o carreamento de antimicrobianos durante o procedimento.

As placas foram mantidas em temperatura ambiente por no máximo 30 minutos para secagem. Após este período as placas foram incubadas a 35° C por 16-20 horas.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano visível. A película causada pelo depósito bacteriano foi desconsiderada. CIM₅₀ e CIM₉₀ foram definidas como a concentração inibitória mínima para inibir o crescimento bacteriano de 50% e 90% das amostras, respectivamente.

FIGURA 10 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DO MÉTODO DE ÁGAR DILUIÇÃO UTILIZADO

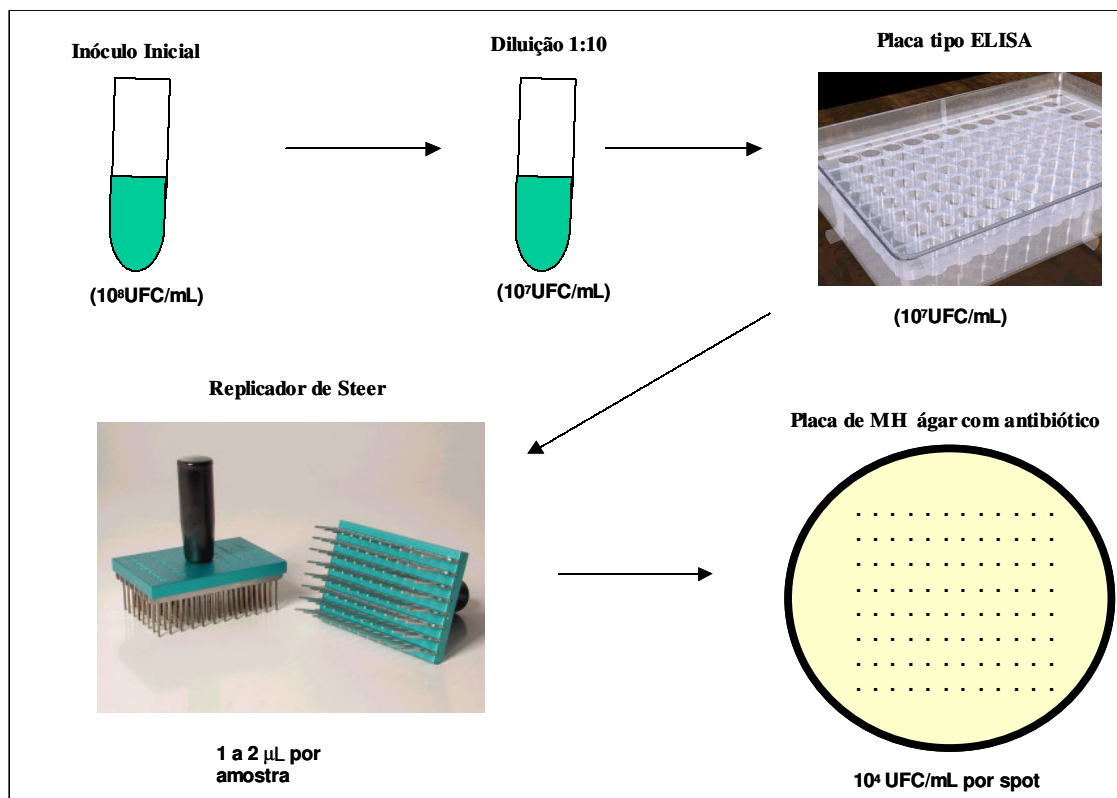
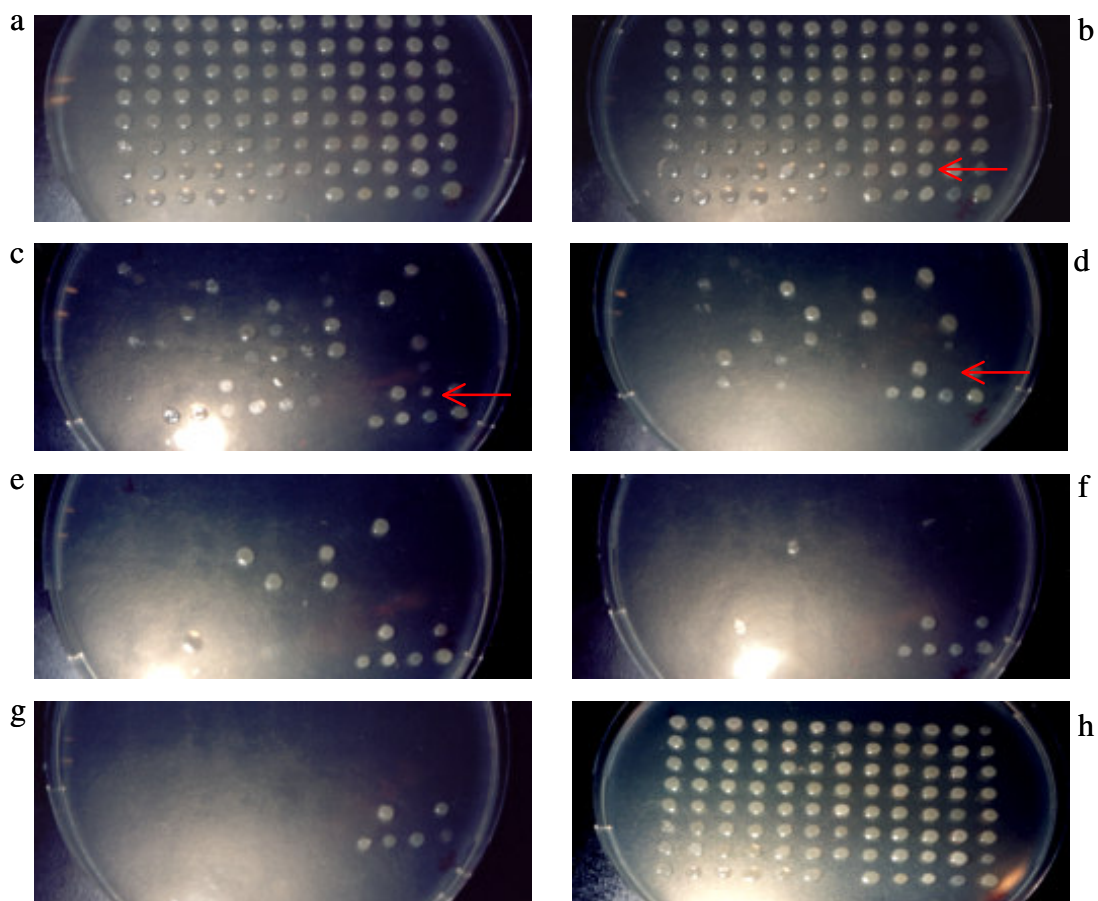


FIGURA 11 - EXEMPLO DA DETERMINAÇÃO DA CIM DO ÁCIDO NALIDÍXICO PELO MÉTODO DE ÁGAR-DILUIÇÃO



NOTA: Na figura, 96 amostras de *E. coli* foram inoculadas em ágar MH com concentrações crescentes de ácido nalidixico (NAL). Em a) placa controle sem NAL, b) ágar MH com 0,5 µg/mL de NAL, c) ágar MH com 1 µg/mL de NAL, d) ágar MH com 2 µg/mL de NAL, e) ágar MH com 4 µg/mL de NAL, f) ágar MH com 8 µg/mL de NAL, g) ágar MH com 16 µg/mL de NAL e h) placa controle sem NAL.

NOTA EPECÍFICA: → indica a concentração inibitória mínima (CIM), determinada como a menor concentração onde não houve desenvolvimento bacteriano que a bactéria no exemplo foi na diluição de 2 µg/mL (d).

4.4 PESQUISA DE MUTAÇÕES NA REGIÃO DETERMINANTE DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS (QRDR) DOS GENES *gyrA* E *parC*

Das 53 amostras resistentes ao ácido nalidíxico, selecionaram-se 10 amostras para pesquisa de mutações nas QRDRs dos genes *gyrA* e *parC*. O critério de seleção das amostras foi baseado nos resultados DD para o ácido nalidíxico e na CIM da ciprofloxacina. Das amostras resistentes estudadas, 5 pertenciam ao grupo 2 (NAL resistentes e fluorquinolonas sensíveis) e 5 pertenciam ao grupo 3 (resistentes a todas as quinolonas, com exceção de uma amostra que apresentou sensibilidade à gatifloxacina nos testes de difusão em ágar e ágar-diluição). Foram incluídos, ainda, dois isolados sensíveis às quinolonas (grupo 1).

A investigação da presença de mutações que conferem resistência às quinolonas foi realizada por PCR (Polimerase Chain Reaction) e seqüenciamento do produto de PCR. A região amplificada compreende o local onde as QRDRs dos genes *gyrA* e *parC* estão localizadas.

4.4.1 Extração do DNA bacteriano

O método de extração do DNA foi segundo BROWN & AMYES (1998), modificando apenas a quantidade da amostra utilizada na PCR. Após isolamento em ágar sangue, três colônias de cada isolado foram transferidas para tubos do tipo eppendorff de 1,5 mL com 300 µL de H₂O (ultrapura, esterilizada por membrana filtrante 0,2 µm de diâmetro da Millipore®), homogeneizadas em agitador do tipo vortex, aquecidas a 100°C em termobloco por 10 minutos, resfriadas em temperatura ambiente e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos. Quinze microlitros do sobrenadante foram utilizados em cada reação de amplificação.

4.4.2 Amplificação da QRDR dos genes *gyrA* e *parC* por PCR

Na reação de amplificação foram utilizados os “primers” ou iniciadores (Tabela 10) para o gene *gyrA*: 5' CCGTCGCGTACTTTACGC 3' (fita sentido) e 5' CGTTCACCAGCAGGTTAG 3' (fita antisentido). Para o gene *parC*: 5' TCTGAACTGGGCCTGAATG 3' (fita sentido) e 5' CTCAATAGCAGCTCGGAATA 3' (fita antisentido) (GEORGIOU et al., 1996; EVERET et al, 1996). Foi preparada uma solução (master mix) para PCR contendo H₂O ultrapura estéril, tampão de reação da enzima (10X concentrado), MgCl₂ 50 mM, dinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) 0,2 mM cada, solução de iniciadores (primer mix) contendo as fitas sentido (sense) e anti-sentido (anti-sense) 50 pM cada e 2,5 unidades da *Taq* DNA polimerase (MGM®). O volume final foi de 60 µL de reação, 45 µL da master mix e 15 µL da amostra. A solução mãe (master mix) foi preparada de forma semelhante para os dois genes, mudando apenas os primers.

TABELA 10 - INICIADORES UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA QRDR DOS GENES *gyrA* e *parC*

			REGIÃO ALVO (Nucleotídeos)	Nº DE PARES DE BASE
GENE	SEQUENCIA			
<i>gyrA</i>	Sentido	5' CCGTCGCGTACTTTACGC 3'	135 - 448	313
	Anti-sentido	5' CGTTCACCAGCAGGTTAG 3'		
<i>parC</i>	Sentido	5' TCTGAACTGGGCCTGAATG 3'	148 - 401	253
	Anti-sentido	5' CTCAATAGCAGCTCGGAATA 3'		

A termociclagem foi realizada em aparelho da Eppendorff®. O programa incluiu um estágio preliminar de 10 minutos a 95º C, seguidos de 35 ciclos a 90º C por 1 minuto, 58º C (*gyrA*) ou 53º C (*parC*) por 1 minuto e 72º C por 3 minutos. Os produtos da reação foram conservados em freezer a -20º C.

Oito microlitros do produto amplificado foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, por cerca de uma hora a uma voltagem constante de 100 V. Na seqüência, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 20 minutos, visualizados e fotografados sob luz UV em transiluminador.

4.5 SEQUENCIAMENTO DO PRODUTO AMPLIFICADO

As amostras foram seqüenciadas no laboratório ALERTA da disciplina de Doenças infecciosas e parasitárias da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (Unifesp/EPM), com o apoio da Dra. Ana Cristina Gales, que gentilmente disponibilizou os insumos e a infra-estrutura necessários para a realização desse método.

4.5.1 Purificação do produto de PCR

O produto de PCR dos genes *gyrA* e *parC* foram purificados com o “Kit Concert Rapid PCR Purification System” (Life Technologies, Valencia, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. Após a purificação do produto foi realizada eletroforese para quantificar o DNA por meio de comparação visual a outro gel com quantidades conhecidas de DNA (controle do Kit de seqüenciamento), sendo avaliados o tamanho e a intensidade das bandas formadas. Foi realizada a diluição da amostra quando necessária.

4.5.2 Seqüenciamento

O DNA foi seqüenciado pelo método de terminação de cadeia com dideoxinucleotídeos (ddNTPs) e revelado com corantes fluorescentes (Big Dye® - Applied biosystems). Para cada teste foram realizadas duas reações, uma para a fita sentido e outra para a fita anti-sentido. A reação de seqüenciamento foi

preparada em dois tubos de microcentrífuga, utilizando-se de 2 a 10 μL da amostra purificada, conforme a quantidade de DNA presente nas mesmas.

Os iniciadores utilizados foram os mesmos da PCR, porém numa concentração menor (5 μM) e em reações separadas. O volume final da reação foi de 20 μL : 4 μL da mistura de reação Big Dye, 4 μL de tampão 2,5 X concentrado, 2 μL do primer e 10 μL da amostra pura ou diluída com água ultrapura.

Depois de preparada a reação, os tubos foram colocados em termociclador com o seguinte programa: um ciclo de 94° C por 2 minutos, 96° C por 10 segundos, 50° C por 30 segundos e extensão final de 60° C por 4 minutos.

4.5.3 Precipitação de DDNTPs não incorporados

Ao final da reação de PCR o produto foi precipitado para eliminação dos DDNTPs marcados que não foram incorporados na reação. O produto do seqüenciamento foi transferido para novos tubos, foram adicionados 80 μL de isopropanol a 75%, homogeneizados em vortex e centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos, a 22° C. O isopropanol foi removido com pipeta. O passo seguinte foi adicionar 100 μL de etanol a 70%, homogeneizar em vortex e centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. O etanol foi removido, as amostras secas por 1 minuto em termo-bloco a 94° C. Foram adicionados 20 μL de TSR (polímero que acompanha o Kit de seqüenciamento). As amostras foram submetidas a um choque térmico: termo-bloco 1 minuto a 94° C e, em seguida, os tubos foram colocados por 3 minutos no freezer a -20° C.

4.5. Determinação da seqüência do DNA

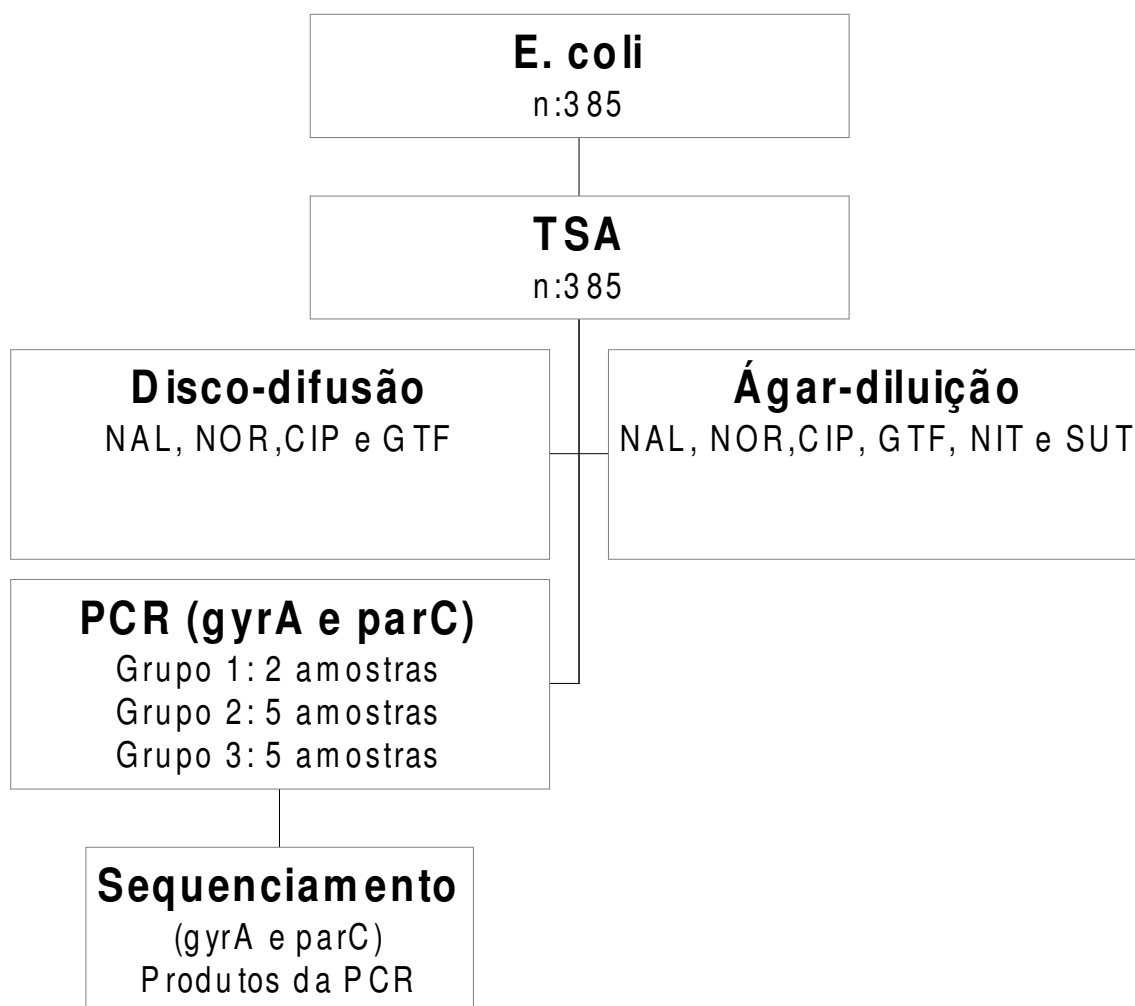
As amostras foram transferidas para os tubos de sequenciamento e estes colocados no aparelho ABI BioPrism 310 (Foster City, Califórnia, EUA). A interpretação análise e edição das seqüências foram realizadas com o auxílio do “software Sequencing Analysis” do aparelho ABI BioPrism 310. A comparação com

as seqüências conhecidas já publicadas dos genes *gyrA* e *parC*, para pesquisa das mutações, foi realizada no mesmo software.

4.6 SÍNTESE DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS NESTE TRABALHO

Trezentos e oitenta e cinco amostras de *E. coli* foram submetidas ao teste de SENSIBILIDADE aos antimicrobianos (TSA) por dois métodos, difusão em ágar e ágar diluição (método de referência). As seguintes quinolonas foram avaliadas pelo método de difusão em ágar, ácido nalidíxico (NAL), norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP) e gatifloxacina (GTF). A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de ágar diluição. Além das quinolonas citadas, nitrofurantoína (NIT) e sulfametoxazol/trimetoprim (SUT) foram incluídos. Doze amostras foram selecionadas para a pesquisa de mutações nos genes *gyrA* e *parC* que conferem resistência às quinolonas, o critério de seleção dessas amostras foi baseado na CIM da CIP. Das doze amostras, duas pertenciam ao grupo 1 (sensível às quinolonas), cinco pertenciam ao grupo 2 (resistentes somente ao ácido nalidíxico) e cinco pertenciam ao grupo 3 (resistentes às quinolonas). A seqüência dos procedimentos realizados está na figura 12.

FIGURA 12 – DIAGRAMA SIMPLIFICADO DOS PROCEDIMENTOS TÉCNICOS REALIZADOS



5 RESULTADOS

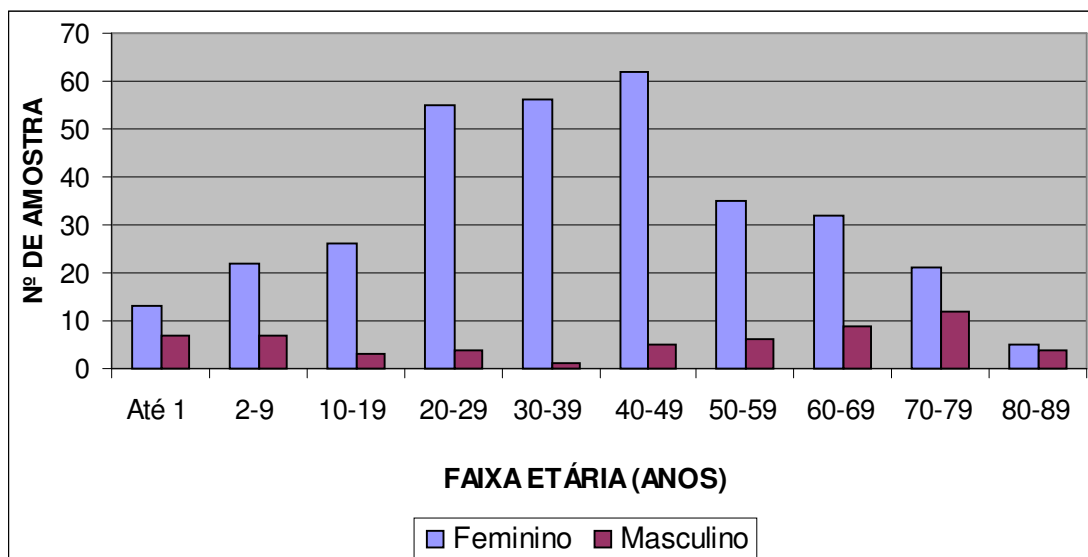
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

No período de maio a novembro de 2002, foram coletadas 385 amostras de *E. coli*, isoladas em urocultura, processadas no período do estudo. Todas com desenvolvimento bacteriano único, a maior parte (91,5%) com contagem de colônias igual ou superior a 10^5 UFC/mL, e o restante com contagem superior a 10^4 UFC/mL.

A origem dos pacientes era predominantemente ambulatorial. As mulheres participaram com o maior número de amostras, 327 (84,9%), e os homens com 58 (15,1%).

Quanto à idade, as amostras foram distribuídas por faixa etária, com intervalo de 10 em 10 anos, com exceção da primeira década, que foi avaliado o número de amostras até 1 ano e de 2 a nove anos (Figura 13). O número de amostras (A) femininas (F) e masculinas (M) por faixa etária foi: 20 A até 1 ano (13 F e 7 M), 29 A entre 2 e 9 anos (22 F e 7 M), 29 A entre 10 e 19 anos (26 F e 3 M), 59 A entre 20 e 29 anos (55 F e 4 M), 57 A entre 30 e 39 anos (56 F e 1 M), 67 A entre 40 e 49 anos (62 F e 5 M), 41 A entre 50 e 59 anos (35 F e 6 M), 41 A entre 60 e 69 anos (32 F e 9 M), 33 A entre 70 e 79 anos (21 F e 12 M) e 9 A entre 80 e 89 anos (5 F e 4 M). Observa-se que as amostras masculinas foram mais freqüentes nos extremos da faixa etária e as femininas entre os 20 e 50 anos.

FIGURA 13 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS DE *E. coli* ISOLADAS DE PACIENTES DO GÊNERO FEMININO E MASCULINO, SEGUNDO A FAIXA ETÁRIA



Os resultados retrospectivos do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, teste realizado pelo método automatizado WalkAway® (Dade Behring™), estão sumarizados na Tabela 11. Sulfametoxazol e ampicilina são os antibióticos com menor atividade para os microorganismos testados. Ceftriaxona apresentou o melhor resultado, com apenas um isolado resistente, os demais antibióticos apresentaram percentual de resistência entre 3,7% e 8,8%.

TABELA 11 – PERCENTUAL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS DETECTADO PELO MÉTODO AUTOMATIZADO WALKAWAY® DE 385 ISOLADOS DE *E. coli*.

PERCENTUAL DE RESISTÊNCIA DE 385 ISOLADOS DE <i>E. coli</i> TESTADOS						
NOR	AMP	CFZ	CRO	GENTA	NITRO	SUT
8,8	51,7	6,5	0,26	3,7	5,4	46,4

(NOR) Norfloxacin, (AMP) Ampicilina, (CFZ) Cefazolina, (CRO) Ceftriaxona, (GENTA) Gentamicina, (NIT) Nitrofurantoína, (SUT) Sulfametoxazol.

5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE ÀS QUINOLONAS POR DISCO DIFUSÃO EM ÁGAR

O resultado do TSA por DD ao ácido nalidíxico, norfloxacin, ciprofloxacina e gatifloxacina demonstrou variação nas quatro quinolonas testadas. Foi detectada resistência a pelo menos uma quinolona em 52 amostras, das quais 18 amostras apresentaram resistência somente ao ácido nalidíxico (foram incluídas neste grupo as 3 amostras com resultado intermediário para o NAL).

Os gráficos das figuras 14 e 15 apresentam a relação entre a idade e o número de isolados para amostras femininas e masculinas. Entre as mulheres, o número de amostras é maior entre 20 e 50 anos de vida, as amostras resistentes, no entanto, estão concentradas entre a faixa de 15 e 30 anos e acima dos 60. Entre os homens, o número de amostras é elevado na primeira década, apresentando poucos isolados resistentes; a partir dos 30 anos há uma proporção entre o número de amostras e o número de isolados resistentes, ambos aumentam gradativamente com a faixa etária, principalmente acima dos 60 anos.

As quinolonas testadas pelo método de difusão em ágar mostraram fenótipos variados de resistência, os predominantes foram resistência aos quatro antimicrobianos testados (26 amostras) e resistência apenas ao ácido nalidíxico e sensibilidade aos demais (18 amostras), fenótipos 1 e 2, respectivamente (Tabela 12).

TABELA 12 - DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

FENÓTIPO	NAL	NOR	CIP	GTF	TOTAL
1	R	R	R	R	26
2	R	S	S	S	15
3	R	I	R	S	2
4	R	S	I	I	1
5	R	R	R	I	4
6	R	R	R	S	1
7	I	S	S	S	3

(NAL) ácido nalidíxico, (NOR) norfloxacin, (CIP) ciprofloxacina, (GTF) gatifloxacina
R, resistência; S, sensibilidade; I, intermediário

FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE AMOSTRA E NÚMERO DE AMOSTRAS RESISTENTES PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR POR FAIXA ETÁRIA EM AMOSTRAS FEMININAS

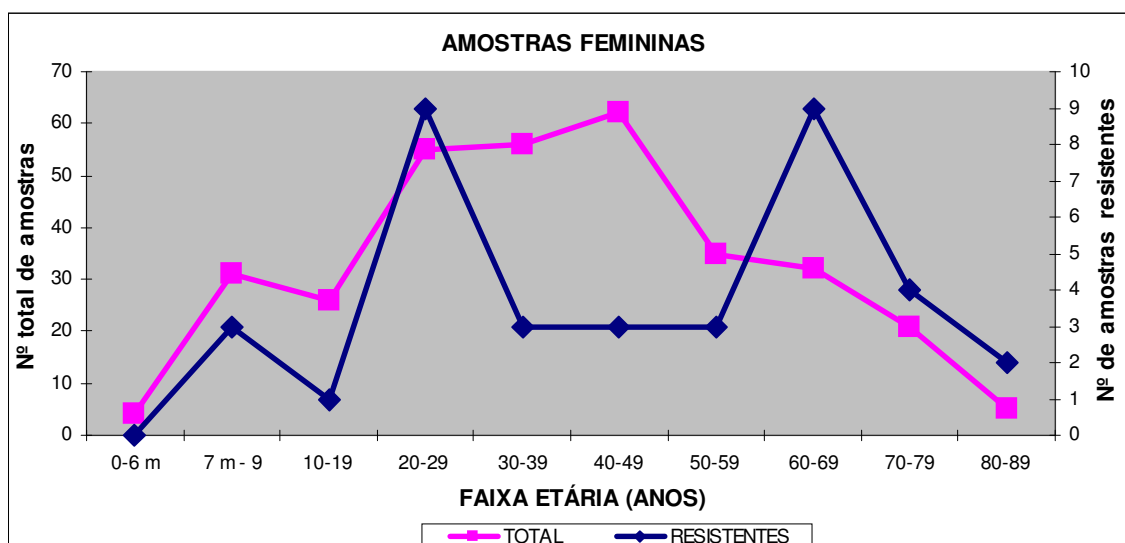
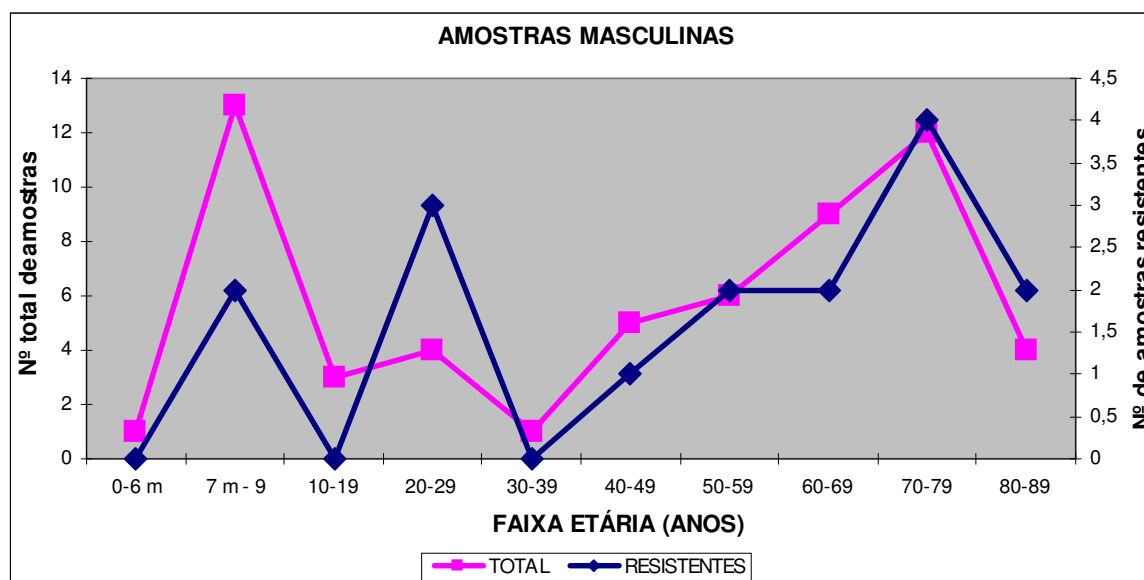


FIGURA 15 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE AMOSTRA E NÚMERO DE AMOSTRAS RESISTENTES PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR POR FAIXA ETÁRIA EM AMOSTRAS MASCULINAS



5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Das 385 amostras de *E. coli* testadas, 53 apresentaram resistência no mínimo a uma quinolona testada pela técnica de ágar-diluição, equivalente a 13,8% de resistência geral às quinolonas.

Ciprofloxacina e gatifloxacina apresentaram as menores concentrações capazes de inibir a maioria (cerca de 86%) dos isolados, com diferença de 1 a 2 diluições entre ambas ($\leq 0,03 \mu\text{g/mL}$ e $0,06-0,12 \mu\text{g/mL}$), respectivamente. Norfloxacin apresentou uma diluição maior que a da gatifloxacina para inibir 87,5% dos isolados. Para nitrofurantoína, cerca de 95% das amostras de *E. coli* foram inibidas com uma CIM de $32 \mu\text{g/mL}$. Devido ao fato do Sulfametoxazol/Trimetoprim ter um percentual de resistência elevado, somente 47,7% dos isolados de *E. coli* foram inibidos com a maior concentração abaixo do ponto de corte. Esses dados podem ser observados na Tabela 13.

TABELA 13 – DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS E PERCENTUAL CUMULATIVO POR CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELO MÉTODO DE ÁGAR-DILUIÇÃO

ÁCIDO NALIDÍXICO										
CIM (µg/mL)	≤1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥512
N	8	223	99	2	3	1	4	2	5	38
%	(2,1)	(60)	(85,7)	(86,2)	(87)	(87,3)	(88,3)	(88,8)	(90,1)	(100)

NORFLOXACINA														
CIM (µg/mL)	≤0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥256
N	3	188	130	16	7	5	1	1	2	2	6	10	7	7
(%)	(0,8)	(49,6)	(83,4)	(87,5)	(89,3)	(90,6)	(90,9)	(91,2)	(91,7)	(92,2)	(93,8)	(96,4)	(98,2)	(100)

CIPROFLOXACINA											
CIM (µg/mL)	≤0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	2	4	8	16	32	≥64
N	248	83	5	12	3	1	1	3	6	13	10
%	(64,4)	(86)	(87,3)	(90,4)	(91,2)	(91,4)	(91,7)	(92,5)	(94)	(97,4)	(100)

GATIFLOXACINA												
CIM (µg/mL)	≤0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	4	8	16	32	≥64
N	7	178	126	22	8	8	2	3	12	6	9	4
%	(1,8)	(48)	(80,7)	(86,4)	(88,5)	(90,6)	(91,1)	(91,9)	(95)	(96,6)	(98,9)	(100)

NITROFURANTOÍNA							
CIM (µg/MI)	≤4	8	16	32	64	128	≥256
N	3	5	187	169	14	5	2
%	(0,8)	(2,1)	(50,7)	(94,6)	(98,2)	(99,5)	(100)

SULFAMETOXAZOL/TRIMETOPRIM									
CIM (µg/mL)	≤0,6/0,03	1,2/0,06	2,4/0,12	4,7/0,25	9,5/0,5	19/1	38/2	76/4	≥304/16
N	8	57	100	17	6	5	3	3	186
%	(2,1)	(16,9)	(42,9)	(47,3)	(48,8)	(50,1)	(50,9)	(51,7)	(100)

No que se refere à potência, ciprofloxacina foi a quinolona que mais se destacou com $CIM_{50} \leq 0,015 \mu\text{g/mL}$ para os 385 isolados de *E. coli* testados (Tabela 14). Contudo, o percentual de inibição de crescimento bacteriano foi igual ao da norfloxacina (91,4%) e um pouco menor que o da gatifloxacina (92,7%). O ácido nalidíxico apresentou os piores índices em relação à potência (CIM_{50} de $2 \mu\text{g/mL}$) e à sensibilidade (86,2%).

Além das quinolonas, foi determinada a CIM da nitrofurantoína e do sulfametoxazol/trimetoprim (SUT). A nitrofurantoína mostrou boa atividade, inibindo o crescimento bacteriano de 94,6 % das amostras; já a taxa de sensibilidade para o SUT foi muito baixa (53,2 %). Ambas não apresentaram potência tão boa quanto à das quinolonas, CIM_{50} de $16 \mu\text{g/mL}$ e CIM_{50} de $9,5/0,5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Para avaliar se havia diferença na sensibilidade ao SUT e à NIT entre amostras de *E. coli* resistentes e sensíveis às quinolonas, foi realizada uma análise separada desses grupos. Nas amostras sensíveis às quinolonas (n: 332), a sensibilidade à nitrofurantoína aumentou para 98,5 % e, nas resistentes (n: 53), ela caiu para 72 %. Sulfametoxazol/trimetoprim foi sensível em 51,2 % das amostras sensíveis e em 43,4 % das resistentes às quinolonas (Tabelas 14 e 15).

TABELA 14 – POTÊNCIA E ATIVIDADE DOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS PELO MÉTODO DE ÁGAR-DILUIÇÃO EM 385 AMOSTRAS *E. coli*

ANTIMICROBIANO	$CIM_{50} \mu\text{g/mL}$	$CIM_{90} \mu\text{g/mL}$	% Sensibilidade
Ácido nalidíxico	2	256	86,2
Norfloxacina	0,12	1	91,4
Ciprofloxacina	$\leq 0,015$	0,12	91,4
Gatifloxacina	0,06	0,5	92,7
Nitrofurantoína	16	32	94,6
Sulfametoxazol/Trimetoprim	9,5/0,5	$\geq 304/16$	53,2

TABELA 15 – PERCENTUAL DE SENSIBILIDADE À NITROFURANTOÍNA E AO SULFAMETOXAZOL/TRIMETOPRIM EM AMOSTRAS SENSÍVEIS E RESISTENTES ÀS QUINOLONAS

ANTIMICROBIANO	QUINOLONAS	
	Sensíveis (n: 332)	Resistentes (n: 53)
NITROFURANTOÍNA	98,5 %	72 %
SULFAMETOXAZOL/TRIMETOPRIM	51,2 %	43,4 %

Das 385 amostras de *E. coli* testadas, 53 amostras apresentaram resistência no mínimo a uma quinolona testada pela técnica de ágar-diluição. Com base nesses resultados, as amostras de *E. coli* foram divididas em três grupos: grupo 1 compreende as amostras (n: 332) sensíveis às 4 quinolonas testadas; grupo 2 representa as amostras (n: 19) resistentes ao ácido nalidíxico e sensíveis às demais quinolonas; no grupo 3 estão as amostras (n: 34) resistentes a todas as quinolonas testadas.

Os resultados dos métodos de difusão em ágar (DD) e diluição em ágar (AD) das quinolonas testadas foram comparados por meio do teste de acurácia. Os dados foram plotados num gráfico, onde, no eixo das abscissas (X), encontram-se os diâmetros dos halos de inibição do fármaco fornecidos pelo DD e, no eixo das ordenadas (Y), as CIMs, determinadas por AD, considerado o método de referência (Figura 16). As discrepâncias entre os dois métodos foram classificadas em erros do tipo alfa, falsa resistência; e erros do tipo beta, falsa sensibilidade (JEKEL, 1999). Erros do tipo alfa (falsa resistência) não ocorreram em nenhuma amostra. Os erros do tipo beta (falsa sensibilidade) ocorreram em 3 casos das 385 amostras de *E. coli* avaliadas, 1 caso com NAL, 1 com NOR e 1 envolvendo a GTF. Essas quinolonas também apresentaram discrepâncias na categoria Intermediário. No entanto, esses resultados não interferiram na avaliação da sensibilidade e especificidade pois a categoria “intermediário” foi incluída no grupo dos resistentes. Ciprofloxacina foi a única quinolona testada que não apresentou nenhuma discrepância entre os dois métodos.

A correlação entre os dois métodos para as quinolonas é a que segue e os valores de Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor preditivo positivo e negativo

(VPP e VPN) e Taxa de erros do tipo alfa e beta estão na tabela 16 . Para o NAL, das 333 amostras sensíveis pelo DD, 332 apresentaram CIM ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ (sensíveis) pelo método de ágar diluição e uma amostra apresentou CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$ (intermediário). Das 3 amostras intermediárias pelo método de DD, 1 foi classificada como intermediária (CIM = 16 $\mu\text{g/mL}$) e 2 como resistentes (CIMs de 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$). Todas as amostras resistentes ao NAL apresentaram CIMs ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$, com exceção de 1 amostra que apresentou CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$ (intermediário).

Duas amostras foram classificadas como intermediárias para NOR pelo DD, a determinação da CIM revelou uma amostra intermediária (CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$) e outra resistente (CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$). O resultado da GTF demonstrou 5 amostras intermediárias no DD, 4 delas apresentaram CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$ (resistente) e 1 com CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$ (intermediário). Entre as amostras sensíveis pelo DD, 1 foi classificada na categoria intermediário (CIM de 4 $\mu\text{g/mL}$) no método de diluição em ágar.

TABELA 16 – RESULTADO DO TESTE DE ACURÁCIA ENTRE OS MÉTODOS DE DIFUSÃO E DILUIÇÃO EM ÁGAR PARA OS 385 ISOLADOS DE *E. coli*.

QUINOLON	S	E	VPP	VPN	ERRO	ERRO
A	(%)	(%)	(%)	(%)	ALFA (%)	BETA (%)
NAL	98,7	100	100	99,7	0	1,9
NOR	97	100	100	99,7	0	2,9
CIP	100	100	100	100	0	0
GTF	97	100	100	99,7	0	3,0

LEGENDA: Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor preditivo positivo (VPP) e Valor preditivo negativo (VPN), ácido nalidíxico (NAL), norfloxacin (NOR), ciprofloxacina (CIP) e gatifloxacina (GTF).

O poder discriminatório do ácido nalidíxico em detectar resistência a outras quinolonas, por meio do método de ágar difusão, foi avaliado (Figura 17). Todas as 333 amostras com halo de inibição ≥ 19 mm para o NAL (amostras sensíveis) eram também sensíveis a NOR, CIP e GTF. As 49 amostras resistentes ao ácido nalidíxico foram classificadas pelo método de ágar-diluição em três categorias (R, S

e I) para as fluorquinolonas: Resistentes (NOR: 32 A, CIP: 33 A e GTF: 31 A); Sensíveis (NOR: 15 A, CIP: 15 A e GTF: 16 A) e duas amostras com resultado intermediário para NOR e GTF e uma para CIP. Em relação à categoria intermediário, as 3 amostras com este resultado para o NAL foram classificadas como sensíveis a NOR, CIP e GTF. A sensibilidade e a especificidade do disco de ácido nalidíxico (30µg), no método de difusão em ágar, em detectar resistência à NOR, CIP e GTF foi de 100% e 95% respectivamente. O valor preditivo negativo (VPN) foi de 100% para as três quinolonas citadas, já o valor preditivo positivo (VPP) foi de 65,4% para NOR e CIP; e de 63,5% para GTF.

As amostras resistentes ou intermediárias ao NAL e sensíveis às outras quinolonas testadas apresentaram elevação da CIM em 2 ou mais diluições. Por exemplo, quando as amostras eram sensíveis à CIP e ao NAL, 99% delas apresentaram CIM entre 0,015 e 0,03; no entanto, quando sensíveis à CIP e resistentes ao NAL (n:15), 13 amostras apresentaram CIMs entre 0,12 e 0,25 µg/mL. O mesmo foi observado para a GTF e a NOR, 94% das amostras sensíveis à GTF e ao ácido nalidíxico apresentaram CIMs entre 0,03 e 0,06. Quando as amostras apresentavam resistência ao NAL e sensibilidade à GTF, as CIMs ficaram acima de 0,25 µg/mL. Para NOR e NAL sensíveis, 96% das amostras apresentam CIMs entre 0,06 e 0,12 µg/mL e, quando NAL resistente, as CIMs situam-se entre 0,25 e 0,5 µg/mL.

FIGURA 16 - COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm (DD) COM A CIM EM $\mu\text{g/mL}$ (AD) DAS QUINOLONAS TESTADAS

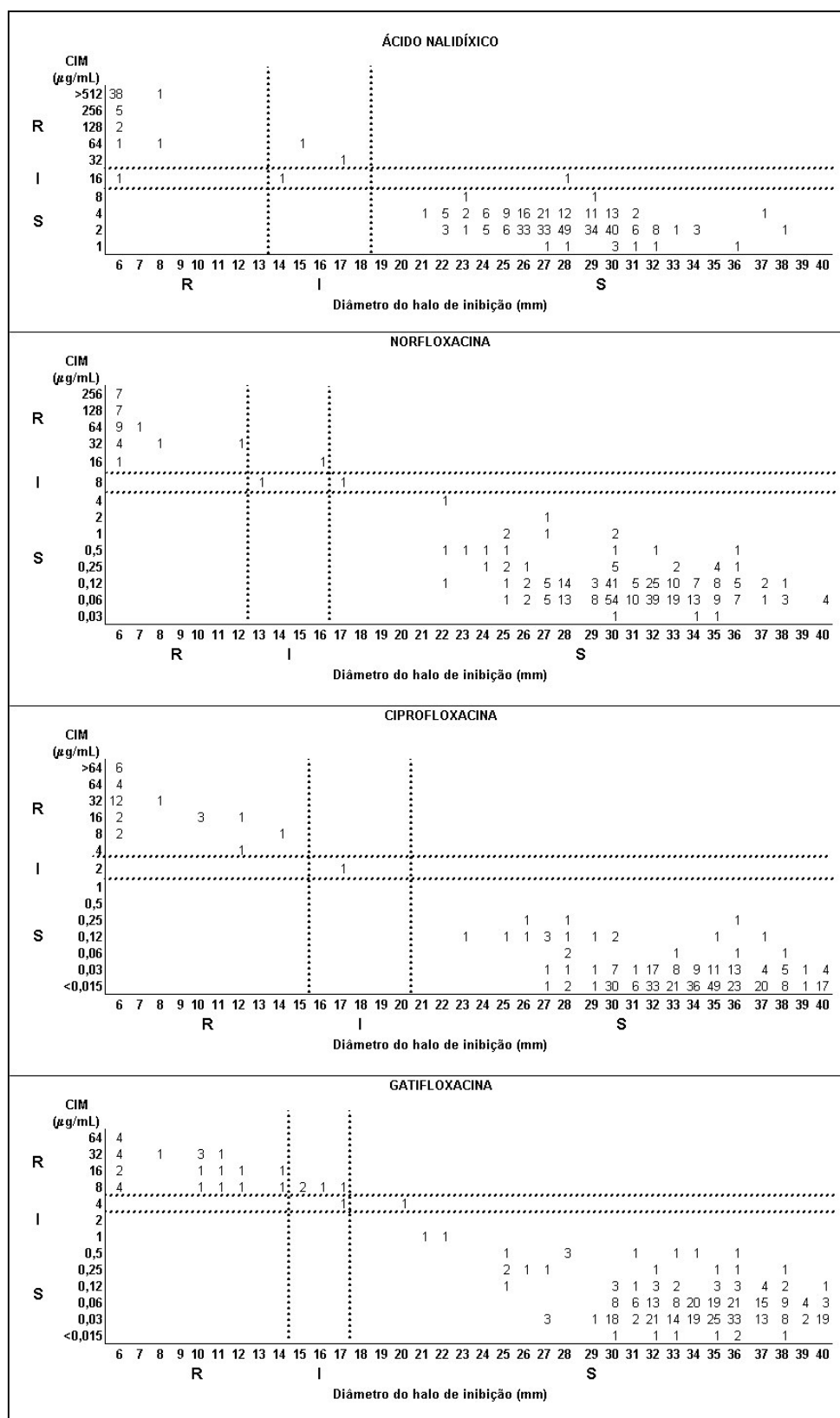
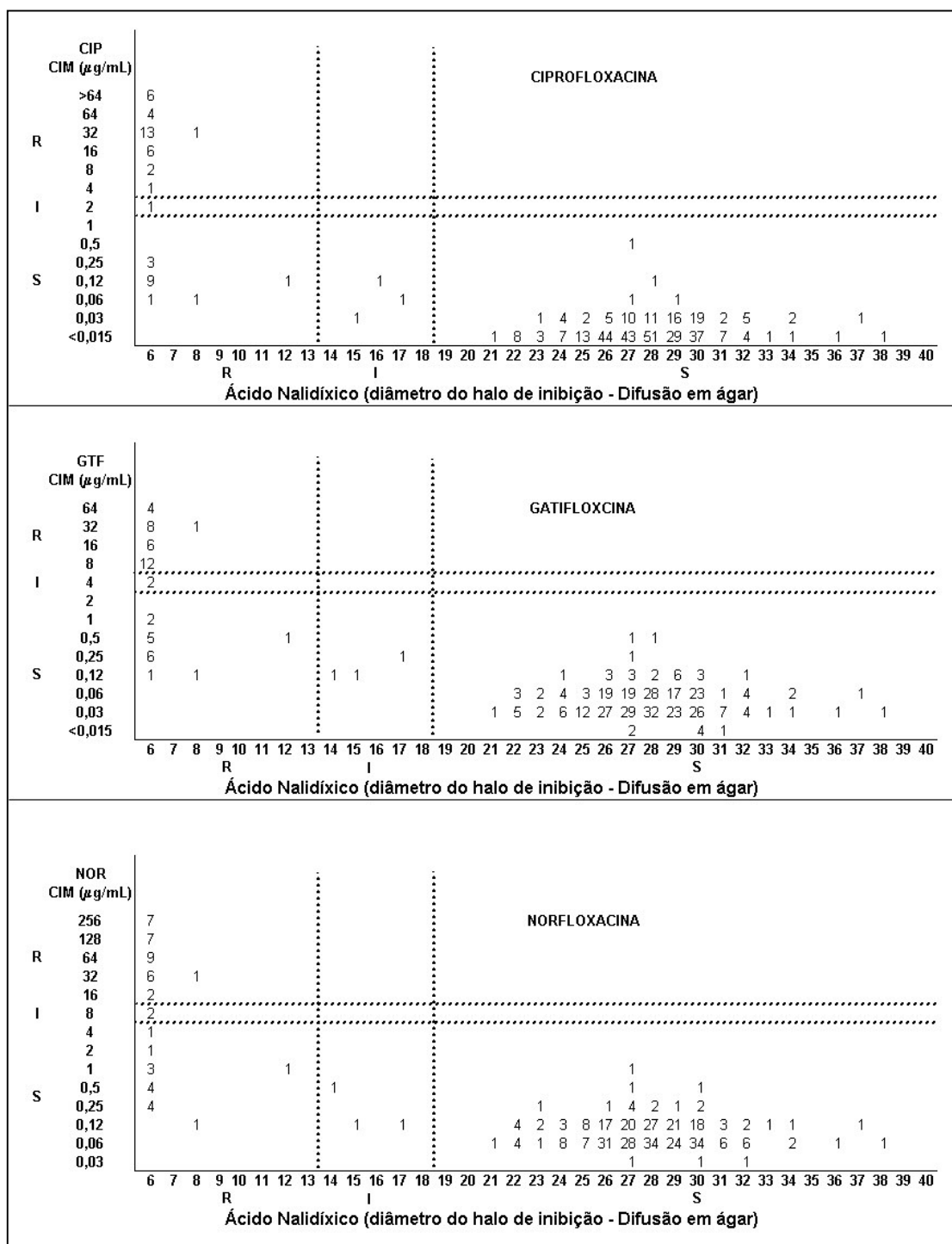


FIGURA 17 - COMPARAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO EM mm (DD) DO ÁCIDO NALIDÍXICO COM A CIM EM $\mu\text{g/mL}$ (AD) DA NORFLOXACINA, CIPROFLOXACINA E GATIFLOXACINA NAS 385 AMOSTRAS ESTUDADAS.



Para se observar a variação na CIM da ciprofloxacina, os três grupos de amostras (1: sensíveis a todas as quinolonas, 2: resistência somente ao ácido nalidíxico, 3: resistente a todas quinolonas) foram distribuídos conforme o gênero e a CIM para ciprofloxacina. Os dados foram avaliados estatisticamente com o teste do Qui-quadrado (χ^2).

A frequência dos grupos 1, 2 e 3 não se distribui nos gêneros de forma independente. As maiores contribuições para o valor de χ^2 são as classes: homens no grupo 3 e mulheres no grupo 3. No gênero masculino apareceram bem mais indivíduos no grupo 3 do que se esperaria se essa distribuição fosse independente. Ocorreu o mesmo com as mulheres, porém no sentido inverso, apareceram menos indivíduos no grupo 3 do que se esperava.

Na Tabela 17 podemos observar que as amostras do grupo 1 (quinolonas sensíveis) apresentaram CIM para ciprofloxacina $\leq 0,03 \mu\text{g/mL}$, com exceção de 2 amostras, uma com CIM de $0,06 \mu\text{g/mL}$ e a outra com CIM de $0,012 \mu\text{g/mL}$ (ambas maculinas), e as amostras do grupo 3 (quinolonas resistentes) apresentaram CIM $>$ que $4 \mu\text{g/mL}$. Esses resultados eram esperados uma vez que essa amostras são, respectivamente, sensíveis e resistentes à Ciprofloxacina. No entanto, no grupo 2 (NAL resistente e demais quinolonas sensíveis), apesar de sensíveis à Ciprofloxacina, houve uma significativa elevação da CIM para concentrações acima de $0,06 \mu\text{g/mL}$. Esse evento foi mais freqüente do que o esperado no grupo 2, numa distribuição independente ($p < 0,0005$).

TABELA 17 - DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA POR AD DA CIPROFLOXACINA DOS 385 ISOLADOS DE *E. coli*

GÊNERO	GRUPO	CIM (µg/ml) DA CIPROFLOXACINA														TOTAL
		0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	
F	1	218	72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	290
	2	-	2	3	9	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	2	7	3	4	20
																327
M	1	30	9	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42
	2	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	3	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	4	6	1	2	14
																58
TOTAL																385

LEGENDA:

GRUPOS

1: Amostras sensíveis

2: Amostras resistentes somente ao ácido nalidíxico

3: Amostras resistentes às 4 quinolonas testadas

CIM: Concentração inibitória mínima

F: Feminino

M: Masculino

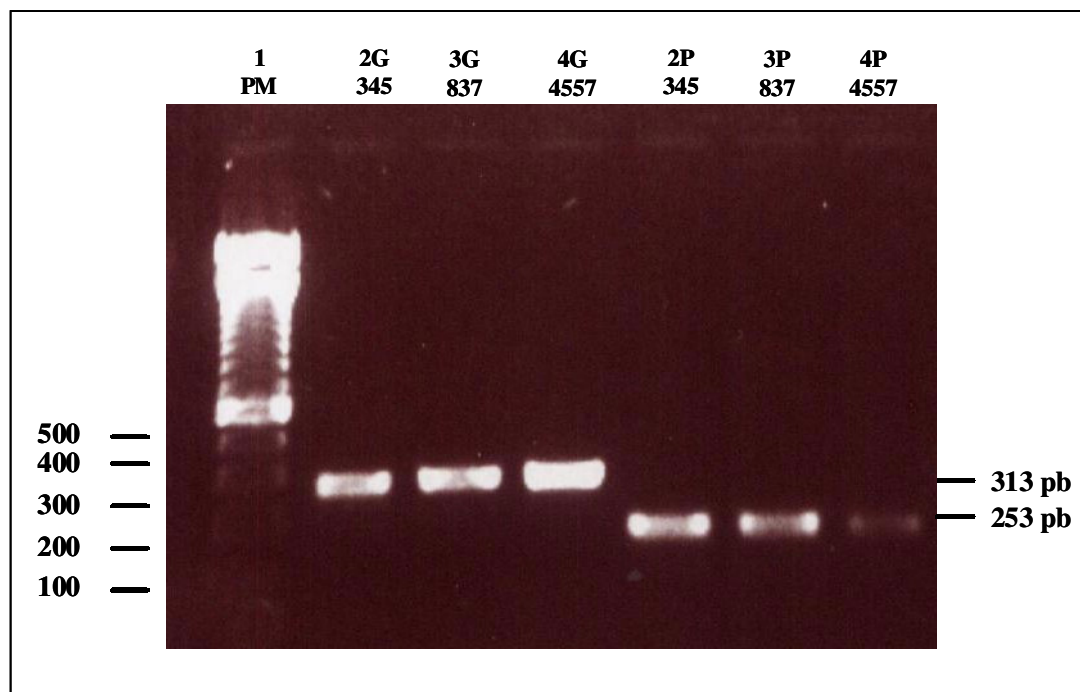
5.4 PESQUISA DE MUTAÇÕES NOS GENES *gyrA* e *parC*

A caracterização genética do principal mecanismo de resistência às quinolonas em *E. coli*, foi realizada em 10 das 53 amostras resistentes ao ácido nalidíxico e duas amostras sensíveis às quatro quinolonas testadas. A escolha das amostras foi baseada nos grupos 1, 2 e 3 com diferentes CIMs para NAL e ciprofloxacina. Foram selecionadas 2 amostras do grupo do grupo 1 (quinolonas sensíveis); 5 amostras do grupo 2 (NAL resistente e demais quinolonas sensíveis) e 5 amostras do 3 (quinolonas resistentes).

5.4.1 Amplificação das QRDRs dos genes *gyrA* e *parC*

As bandas observadas na detecção dos produtos da PCR apresentaram tamanhos correspondentes aos fragmentos esperados, 313 pares de base para *gyrA* e 253 pares de base para *parC* (Figura 18).

FIGURA 18 – PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *gyrA* e *parC* OBTIDOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *E. coli*



LEGENDA:

1 - Marcador de peso molecular 100 pb (gibco-BRL®, Life Technologies)

2G, 3G e 4G – Produto de PCR para o gene *gyrA*. Amostras 345, 837 e 4557

2P, 3P e 4P – Produto de PCR para o gene *parC*. Amostras 345, 837 e 4557

5.4.2 Sequenciamento da QRDR dos genes *gyrA* e *parC*

O resultado da reação de seqüenciamento das 12 amostras selecionadas pode ser observado na Tabela 18. As duas amostras do grupo 1 (amostras sensíveis às quinolonas testadas) não apresentaram mutações na QRDR dos genes estudados. Das 5 amostras resistentes somente ao NAL (grupo 2), 3 apresentaram uma mutação no aminoácido 83 do gene *gyrA*, uma amostra com duas mutações, uma no aminoácido 83 do gene *gyrA* e a outra mutação no aminoácido 80 do gene *parC*. Destas 5 amostras, uma não apresentou mutações. Entre as 5 amostras resistentes às quinolonas (grupo 3), todas apresentaram três mutações, duas no gene *gyrA* (aminoácidos 83 e 87) e uma mutação no aminoácido 80 do gene *parC*. As mutações detectadas no gene *gyrA* foram constantes: na posição 83 o aminoácido serina foi substituído por leucina e na posição 87, o ácido aspártico foi substituído pela asparagina. Para o gene *parC*, 5 amostras com substituição de serina por isoleucina e 1 amostra com substituição de serina por arginina.

As amostras resistentes ao ácido nalidíxico (grupo 3) com três mutações (2 no gene *gyrA* e 1 no gene *parC*) apresentaram CIMs elevadas para CIP (tabela 18). Aquelas com somente uma mutação no gene *gyrA* apresentaram discreta elevação da CIMs para CIP, ainda ficando, entretanto, dentro da categoria sensível. A única amostra com duas mutações, uma mutação no gene *gyrA* e a outra mutação no aminoácido no gene *parC*, apresentou discreta elevação nas CIMs das quinolonas. Nestas amostras a troca no aminoácido 80 do gene *parC* foi por arginina, diferente das amostras que apresentavam três mutações. Resultados semelhantes foram encontrados para NOR e GTF.

TABELA 18 - LOCALIZAÇÃO E TIPO DE MUTAÇÕES NOS GENES *gyrA* E *parC* POR GRUPOS DE AMOSTRAS DE *E. coli*

AMOSTRA	GRUPO	CIM µg/mL		MUTAÇÃO								
		NAL	CIP	gyrA				parC				
				83 Ser	Ala	Val	Tyr	87 Asp	80 Asp	Ser	Ala	
5384	1	1	0,03	..-.....-.....-.....-.....-..						..-.....-.....-.....-..		
9850	1	1	0,015	..-.....-.....-.....-.....-..						..-.....-.....-.....-..		
837	2	64	0,03	..-.....-.....-.....-.....-..						..-.....-.....-.....-..		
4633	2	64	0,25	Leu.....-.....-.....-.....-..						..-.....-.....-.....-..		
9233	2	64	0,12	Leu.....-.....-.....-.....-..						..-.....-.....-.....-..		
4557	2	>512	0,12	Leu.....-.....-.....-.....-..						..-.....-.....-.....-..		
8889	2	>512	0,25	Leu.....-.....-.....-.....-..						..-.....Arg.....-..		
6556	3	>512	8	Leu.....-.....-.....-.....Asn						..-.....Ile.....-..		
345	3	>512	64	Leu.....-.....-.....-.....Asn						..-.....Ile.....-..		
6723	3	>512	64	Leu.....-.....-.....-.....Asn						..-.....Ile.....-..		
5850*	3	>512	4	Leu.....-.....-.....-.....Asn						..-.....Ile.....-..		
6452	3	>512	32	Leu.....-.....-.....-.....Asn						..-.....Ile.....-..		

LEGENDA:

GRUPOS

1: Amostras sensíveis

2: Amostras resistentes somente ao ácido nalidíxico

3: Amostras resistentes às 4 quinolonas testadas

CIM: Concentração inibitória mínima

NAL: Ácido Nalidíxico

CIP: Ciprofloxacina

AMINOÁCIDOS: Ala, alanina; Arg, arginina; Asn, asparagina; Asp, ácido aspártico; Ile, isoleucina; Leu, leucina; Lis, lisina; Tyr, tirosina; Val, valina.

6. DISCUSSÃO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das doenças infecciosas mais comuns, sendo menos freqüente apenas do que as infecções respiratórias. Nos Estados Unidos, as ITUs são responsáveis por 5,2 milhões de consultas médicas anuais, onde 10% das ITUs representam episódios graves e 80% requerem exames laboratoriais e tratamento antimicrobiano. O custo estimado das ITUs em geral, naquele país, ultrapassa 1,5 bilhões de dólares anuais (STAMM & NORRBY, 2001; KARLOWSKY, 2001).

As enterobactérias são os agentes mais comuns de infecção urinária, e dentre estas, *Escherichia coli* é o principal representante nas infecções agudas. Mesmo em infecções hospitalares, onde estão presentes outros patógenos, este microrganismo predomina (BISHARA et al., 1997; WINSTANLEY et al, 1997; VROMEN et al. 1999; GALES et al, 2000).

Neste trabalho foram avaliados os isolados de *E. coli* de urocultura, coletados por jato médio e com contagem de colônias igual ou superior a 10^4 UFC/mL, ponto de corte recomendado pela literatura como critério de diagnóstico microbiológico de ITU. Não foi realizada uma avaliação epidemiológica porque o objetivo do trabalho foi estudar a resistência de *E. coli* às quinolonas utilizadas no trabalho e, por isto, outras bactérias Gram negativas e bactérias Gram positivas foram excluídas, o que poderia interferir numa análise epidemiológica fidedigna.

A incidência de ITUs depende da idade e do gênero do paciente. A ITU é doença que acomete predominantemente as mulheres. A prevalência de bacteriúria em mulheres aumenta gradualmente com a idade, chegando a 10% a 20% em mulheres idosas. A associação de ITU com intercuro sexual pode também contribuir para esta incidência aumentada, porque a atividade sexual aumenta as chances de contaminação da uretra feminina que, sendo mais curta, facilita a ascensão da bactéria. A exposição a espermicidas e o uso prévio de antibióticos são fatores de risco para ITU em mulheres na fase pré-menopausa. A incidência de bacteriúria também aumenta durante a gravidez, como resultado de alterações anatômicas e hormonais que favorecem as ITUs (STAMM & NORRBY, 2001). Para os homens, as ITUs são mais comuns

durante o primeiro ano de vida, associadas principalmente às mal-formações congênitas e após os 60 anos, quando o aumento da incidência de hipertrofia da próstata interfere com o esvaziamento da bexiga predispondo à ITU (NICOLLE, 2001).

Os dados avaliados no presente estudo em relação ao gênero e idade, mostraram uma distribuição de amostras semelhantes aos índices de ITU citados na literatura. Entre os pacientes do gênero masculino, o maior número de amostras foi encontrado no primeiro ano de vida e acima de 60 anos e o número de isolados resistentes aumenta com a idade, possivelmente em decorrência do uso de quinolonas no tratamento de prostatites, onde os antimicrobianos atingem níveis teciduais menores, entre outras causas. Já entre as mulheres, o maior número de casos foi encontrado na faixa etária entre os 20 e 45 anos, e justamente neste período observa-se um número menor de isolados resistentes. explicado em parte pela presença de gestantes neste grupo onde as quinolonas são contra indicadas. Além disso, outros fatores, como o uso prévio de antimicrobianos, podem estar envolvidos mas não puderam ser avaliados.

KARLOWSKY et al. (2002) avaliaram a sensibilidade à Ampicilina e ao SUT em *E. coli* isoladas de ITU em mulheres nos Estados Unidos. Neste trabalho, foram encontrados índices de resistência para ampicilina de 37% e para SUT de 16,1%, sugerindo que outras terapias deveriam ser consideradas de acordo com o índice local de resistência a tais drogas.

Os dados retrospectivos do presente estudo revelaram altos índices de resistência à ampicilina (51,7%) e ao SUT (46,4%). A resistência à ampicilina pode estar associada à disseminação de genes localizados em plasmídios, que codificam enzimas que inativam a ampicilina (geralmente β -lactamases do tipo TEM-1). Resistência ao SUT, por sua vez, é decorrente de alterações nas enzimas diidrofolato redutase e diidropteroato sintetase, principalmente pela aquisição de novos genes localizados em plasmídios. Taxas elevadas de resistência ao SUT (38%-59%) para *E. coli* têm sido descritas em países da América Latina (HUOVINEN, 1997).

WINSTANLEY et al., em 1997, avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas do trato urinário num período de 10 anos.

No trabalho desses autores, a ampicilina mostrou os piores índices de sensibilidade para todas as enterobactérias. Esse resultado condiz com os obtidos no presente trabalho, indicando que esse antibiótico não deve ser utilizado empiricamente para tratamento de ITU.

Durante os anos 70, as taxas de resistência aos β -lactâmicos em microrganismos hospitalares já se mostravam elevadas, 30% dos isolados de *Escherichia coli* eram resistentes à ampicilina e 20 a 30% dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* à cefazolina - fato este que estimulou o uso das cefalosporinas de amplo espectro, tais como a ceftriaxona e a ceftazidima (NEU, 1989).

Em relação às cefalosporinas, os isolados do presente estudo demonstraram um percentual de resistência à cefazolina de 6,5 % e à ceftriaxona de 0,26 %. A sensibilidade moderada dos patógenos urinários frente à cefalotina é preocupante, pois este antibiótico é a droga de primeira escolha para cistites em gestantes, onde o número de antibióticos permitidos é limitado e a presença de infecção é frequente. Provavelmente não foram encontrados altos índices de resistência à ceftriaxona porque a maioria dos isolados eram de pacientes ambulatoriais.

A boa sensibilidade da gentamicina para *E. coli* encontrada neste trabalho (3,7%) não descarta a preocupação com o decréscimo significativo na sensibilidade a estes antimicrobianos em bacilos Gram negativos, por ser uma opção para o tratamento de infecções do trato urinário, tanto em pacientes hospitalizados quanto nos medicados em domicílio (WEBER et al., 1997).

GOETTSCH et al. (2000) demonstraram um aumento na resistência de amoxicilina e SUT nos isolados de *Escherichia coli*, em infecções no trato urinário de pacientes ambulatoriais da Holanda. Com o passar dos anos, fluorquinolonas passaram a ser prescritas mais freqüentemente para o tratamento dessas infecções, ocasionando um aumento de *E. coli* resistente a estes antibióticos, dificultando seu tratamento.

ZHANEL et al. (1998) avaliaram a resistência bacteriana de 2000 isolados do trato urinário de pacientes ambulatoriais no Canadá. Os dados mostraram que a nitrofurantoína e a ciprofloxacina foram mais eficientes que SUT e amoxicilina na terapia empírica dessas infecções.

A resistência antimicrobiana de bactérias Gram negativas, isoladas em urina de pacientes ambulatoriais entre 1983 e 1997, foi analisada por VROMEN *et al* (1999). Durante o período de estudo, a sensibilidade de *E. coli* ao SUT diminuiu de 79% para 62%, aumentou para a nitrofurantoína de 79% para 91% e permaneceu estavelmente baixa para a amoxicilina (41%). Neste mesmo trabalho, os autores demonstraram que a sensibilidade para a norfloxacin, avaliada a partir de 1990, diminuiu de 87% para 71%. Acredita-se que a prescrição empírica deste antimicrobiano foi a responsável por esta mudança na sensibilidade. Este decréscimo observado na sensibilidade da norfloxacin é preocupante. Durante o período de tempo relativamente curto em que tais casos foram avaliados, houve um aumento na resistência destes antibióticos em torno de 25%.

Em outro trabalho em um hospital universitário de Paris, entre 1992 e 1998, ROBERT *et al* (2001) também constataram uma redução na sensibilidade da *E. coli* para fluorquinolonas (pefloxacina, de 95 para 90%; ciprofloxacina, de 99 para 95%).

Pesquisadores estudaram, num hospital de Valencia, 218 casos de cistite aguda em mulheres entre março e novembro de 2000. O elevado índice de isolados de *E. coli* resistentes às quinolonas mostrou-se persistente (18,4% para ciprofloxacina; 19,6% para norfloxacin e 22,3% para o ácido pipemídico). Excelente sensibilidade foi observada para amoxicilina-clavulanato e aminoglicosídeos. Para a ampicilina e o SUT, a resistência também foi alta, respectivamente, 54,7% e 35,8%. A nitrofurantoína apresentou baixos índices (3,3%) de resistência (QUEIPO *et al.*, 2001).

KAPOOR e AGGARWAL, em 1997, encontraram taxas ainda mais altas de resistência para as quinolonas em ITUs nosocomiais em Nova Delhi, cerca de 62% das amostras eram resistentes ao ácido nalidíxico, 52% à norfloxacin e 51% à ciprofloxacina.

No Brasil, um estudo com bactérias isoladas do trato urinário revelou que houve, com o passar dos anos, um aumento gradativo na resistência às quinolonas, entretanto as taxas foram bem menores: 9,1% para a norfloxacin e para a ciprofloxacina e 16,5% para o ácido nalidíxico (LOPES *et al.*, 1998).

No presente trabalho, das 385 amostras de *E. coli* testadas pelo método de difusão em ágar, 52 amostras foram classificadas como resistentes a pelo menos uma quinolona testada. É importante ressaltar que dentre estas 52 amostras, 15 amostras foram classificadas como resistentes e 3 como intermediárias ao ácido nalidíxico, permanecendo sensíveis às demais quinolonas. Houve ainda variação no fenótipo de resistência por este método para 8 amostras, sete envolvendo resultados intermediários, que é a categoria que oferece mais resultados de difícil interpretação (M2-A7, NCCLS, 2000). Ácido nalidíxico foi a quinolona com maior percentual de isolados resistentes (13,5%), seguido da ciprofloxacina (8,8%), norfloxacina (8,6%) e da gatifloxacina (8,0%).

A variação nas taxas de sensibilidade das diferentes quinolonas pode ser explicada pelo mecanismo de resistência, onde o nível de resistência depende da enzima-alvo afetada e do número de mutações acumuladas. Além disso, há uma relação entre o nível de resistência a potência específica de cada fármaco, principalmente para as quinolonas mais novas (SANDERS, 2001).

No presente estudo, os resultados da determinação da CIM dos antimicrobianos testados confirmaram que as quinolonas são fármacos potentes, pois mesmo as mais antigas, como o NAL, exibiram $CIM_{50} \leq 2,0$ $\mu\text{g/mL}$. Valores bem menores que os encontrados para SUT (CIM_{50} 9,5/0,5 $\mu\text{g/mL}$) e para a nitrofurantoína (CIM_{50} 16 $\mu\text{g/mL}$). Entre as quinolonas testadas, esperava-se que a potência e a atividade fossem maiores entre as quinolonas mais novas. Porém, apesar das modificações estruturais presentes na gatifloxacina (GTF), que conferem maior afinidade com os dois alvos (DNA girase e topoisomerase IV), a ciprofloxacina (CIP) apresentou os melhores resultados com $CIM_{50} \leq 0,015$ $\mu\text{g/mL}$ e CIM_{90} de 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Gatifloxacina apresentou $CIM_{50} \leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ e CIM_{90} de 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Apesar das diferenças de potência entre as quinolonas, o índice de sensibilidade foi praticamente o mesmo para as fluorquinolonas (NOR, CIP e GTF), sendo discretamente mais alto para GTF. O mecanismo de resistência cruzada entre as quinolonas poderia explicar índices de sensibilidade semelhantes para fármacos com diferentes potências da mesma classe, já que

um evento mutacional confere elevação na CIM, em 4 a 8 vezes, conferindo alto nível de resistência para as quinolonas mais antigas (menos potentes), como o NAL, e baixo nível de resistência às fluorquinolonas, percebido apenas pela elevação da CIM. A ocorrência de uma amostra sensível somente à gatifloxacina poderia ser explicado pelo fato dessa quinolona interagir nos dois alvos de ação com a mesma intensidade, o que, teoricamente, necessitaria de mais mutações para diminuir a sensibilidade.

Resistência ao SUT tem aumentado em todo o mundo, limitando seu uso como antibiótico empírico. Desde o final da década de 80 já se observava uma notável redução na sensibilidade dos uropatógenos a este antimicrobiano. Em 1989, LAMIKANRA & NDEP, relataram uma incidência de resistência de 63,3%.

WINSTANLEY et al. (1997), relataram uma taxa média de resistência das enterobactérias ao SUT de cerca de 30%. No Brasil, BERDICHEVSKI et al., 1998, demonstraram que 34,25% desta mesma classe de microrganismos estavam resistentes a esta droga. Quando avaliados uropatógenos na América Latina, como realizado pelo programa SENTRY, a frequência de resistência foi 42,6% (GALES, 2000).

O resultado da determinação da CIM₉₀ para SUT encontrado no presente trabalho foi elevada ($\geq 304/16$ µg/mL), com percentual de resistência de 46,8% pelo método de ágar diluição, número muito próximo daquele obtido pelo sistema automatizado (46,4%). Tais dados são semelhantes aos reportados em outros trabalhos. No Brasil, a alta incidência de resistência pode estar associada ao alto consumo deste fármaco, que é distribuído gratuitamente nas unidades de saúde.

O resultado dos seis antimicrobianos, testados no presente trabalho pelo método de diluição em ágar, demonstrou que a nitrofurantoína foi o antibiótico com a menor taxa de resistência entre os isolados *E. coli*, com aproximadamente 95% de sensibilidade. Felizmente, a presença de múltiplos mecanismos de ação têm evitado o surgimento de *E. coli* resistentes a este fármaco. Nitrofurantoína é uma alternativa para tratamento das infecções urinárias não complicadas, mas o estreito espectro de atividade e a baixa distribuição tecidual limitam seu uso em casos complicados de ITU (McCUE, 1997; ZOLER, 1999; KARLOWISKY et al., 2002).

Quando se comparam as duas metodologias (diluição em ágar e difusão em ágar) para as quinolonas testadas, observa-se uma boa relação entre os dois métodos, sensibilidade entre 97%-98% e especificidade de 100%. Os resultados discrepantes estavam relacionados à categoria intermediária, principalmente para o ácido nalidíxico e gatifloxacina. Segundo o NCCLS, documento M2–A7 (2000), essa categoria inclui uma zona tampão para prevenção de eventuais fatores técnicos não controlados, causadores das maiores discrepâncias na interpretação. Isso poderia justificar os resultados discrepantes para NAL e GTF, já que, devido à baixa difusão no ágar do NAL, este é correntemente usado na forma sódica. Para GTF, foi usada uma apresentação diferente da recomendada pela literatura em função da ausência comercial do produto no momento da realização do trabalho. Contudo, os resultados da cepa controle mantiveram-se nos limites confiáveis.

O NAL foi utilizado neste trabalho com intuito de verificar a possibilidade de sua aplicabilidade como indicador de resistência às fluorquinolonas em *E. coli*, uma vez que a determinação da CIM não é amplamente difundida nas rotinas de laboratórios, devido ao seu custo elevado e por ser técnica trabalhosa.

As 333 amostras sensíveis ao NAL (DD) eram também sensíveis às outras quinolonas testadas pelo método de referência (AD). As amostras resistentes ao NAL (49 A) apresentaram resultados variados em relação às categorias S, R e I no método de AD, valor preditivo positivo em torno de 65%. Constatou-se que algumas dessas amostras apresentam sensibilidade às demais quinolonas, porém com elevação nas CIMs para as mesmas. Este fenômeno poderia ser explicado pelo principal mecanismo de resistência, que depende do número de mutações acumuladas. Outros mecanismos de resistência como bombas de efluxo e mutações em genes secundários (*gyrB* e *parE*) podem estar envolvidos, mas, infelizmente, não puderam ser avaliados em função dos custos envolvidos e do tempo necessário para mais análises.

É interessante notar que o número de amostras resistentes ao NAL e sensíveis às fluorquinolonas foi maior entre as mulheres. Entre os homens, a quantidade de amostras totalmente resistentes às quinolonas foi mais freqüente (Tabela 17), talvez pela associação entre ITU e prostatite, onde as quinolonas

são bastante utilizadas apesar dos níveis teciduais serem inferiores aos obtidos no trato urinário, o que facilita a seleção de mutantes resistentes. Em crianças do gênero masculino, alterações funcionais e anatômicas poderiam favorecer a permanência do microorganismo no sítio de infecção, propiciando a seleção de mutantes com alto nível de resistência.

Mutações nos genes que codificam para topoisomerase IV relacionam-se com a diminuição da sensibilidade às quinolonas. Esta enzima é considerada o alvo secundário das quinolonas em *E. coli*, fato referidos em diversos trabalhos científicos, nos quais se observou que a topoisomerase IV da cepa selvagem não é dominante sobre o alelo resistente e a sua inibição, que é primariamente bacteriostática, leva a uma lenta parada na replicação. Mutações podem ocorrer nos genes *parC* e *parE*. Mutações em *parC* ocorrem geralmente nas posições 78, 80 e 84, com substituição de glicina por aspartato, serina por arginina ou isoleucina e glicina por aspartato, respectivamente. Em *parE*, as mutações com troca de aminoácidos não são comuns, mas já foi detectada a troca de leucina por histidina na posição 445 (BROWN & AMYES, 1998).

Patógenos clínicos com diminuição na sensibilidade às quinolonas têm comumente alterações no gene *gyrA* que codifica para a subunidade GyrA da enzima DNA girase. Mutações pontuais que se correlacionam com a sensibilidade diminuída às quinolonas têm sido localizadas numa região chamada “Quinolone Resistance Determining Region” (QRDR). Em *E. coli*, incluem os aminoácidos 67-106 (codificados pelos nucleotídeos 201-320). Este é principal mecanismo em enterobactérias. Mutações no gene *gyrB* de bactérias com diminuída sensibilidade às quinolonas têm sido relatadas, porém com menor importância.

No presente trabalho, para verificar a associação entre o mecanismo genético de resistência e fenótipo das bactérias estudadas, 10 amostras de *E. coli* resistentes e 2 amostras sensíveis às quinolonas foram submetidas à amplificação e seqüenciamento das QRDRs dos genes *gyrA* e *parC* (Tabela 17). O grupo das amostras resistentes era composto de 5 amostras resistentes somente ao NAL (grupo 2), com CIMs para CIP variando entre 0,03 e 0,25 µg/mL, e 5 amostras resistentes a todas as quinolonas (grupo 3), com CIMs

para CIP variando entre 4 e ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$, à exceção de 1 que era sensível à gatifloxacina.

Dentre as cinco amostras de *E. coli* do grupo 2, uma amostra com CIM para CIP de 0,03 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou nenhuma mutação e quatro amostras com CIM para CIP $\geq 0,12$ $\mu\text{g/mL}$ apresentaram mutações nos genes *gyrA* e *parC*. Dessas quatro amostras, 3 apresentaram uma única mutação no gene *gyrA* na posição 83 (Ser \rightarrow Leu) e uma amostra apresentou 2 mutações, uma mutação em *gyrA* na posição 83 (Ser \rightarrow Leu) e outra em *parC* na posição 80 (Ser \rightarrow Arg). Mutação única em *gyrA* determina um baixo nível de resistência às fluorquinolonas, que não é observado no método de difusão em ágar, mas pode ser observado pelo método de diluição em ágar pela elevação na CIM da CIP acima de 0,12 $\mu\text{g/mL}$. A única amostra desse grupo que não apresentou mutação também não apresentou elevação na CIM para CIP, possivelmente outros fatores estão envolvidos como mutações em outras regiões dos genes estudados ou em outros genes.

A despeito de a ciprofloxacina requerer duas ou mais mutações no principal alvo para expressar alto nível de resistência às fluorquinolonas, quinolonas mais antigas, como o ácido nalidíxico, são capazes de expressar alto nível com apenas uma mutação e, a exemplo de outros trabalhos realizados com *E. coli* e *Salmonella*, este antimicrobiano pode ser usado como marcador de resistência às fluorquinolonas pelo método de difusão em ágar (AGUIAR et al., 1992; ENA et al., 1998; HAKANEN et al., 1999; GALES et al., 2000).

As amostras do grupo 3 apresentaram três mutações, duas no gene *gyrA* e uma em *parC*, confirmando a necessidade de mutações múltiplas para a expressão de alto nível de resistência às quinolonas. Duas mutações no alvo principal estão associadas a alto nível de resistência, fato observado nas nossas amostras seqüenciadas. As cinco amostras com resistência à CIP apresentaram três mutações, duas em *gyrA* e uma em *parC*. Em *gyrA*, ocorreu uma troca de aminoácidos na posição 83 (Ser \rightarrow Leu) e na posição 87 (Asp \rightarrow Asn). Em *parC*, a troca de aminoácido ocorreu na posição 80 (Ser \rightarrow Ile). A única amostra resistente ao NAL e sensível à CIP (CIM de 0,25 $\mu\text{g/mL}$), apresentou duas mutações, uma em *gyrA* na posição 83 (Ser \rightarrow Leu) e outra em *parC* na posição

80 (Ser → Arg), fato observado por outros autores e que demonstraram a necessidade do acúmulo de mutações no principal gene de resistência para a quinolona.

EVERETT et al. (1996) estudaram os mecanismos individuais de resistência às fluorquinolonas em isolados veterinários e humanos de *E. coli*, com CIMs para CIP variando entre 2 e 128 µg/mL. Os 36 isolados continham mutação em *gyrA* (troca de serina por leucina no códon 83) e 26 isolados também apresentavam uma mutação no códon 87, com troca de aspartato por asparagina em 14 amostras, por tirosina em 6 amostras, por glicina em 5 amostras e por histidina em 1. Vinte e quatro isolados apresentaram uma única mutação em *parC* no códon 80, a troca da serina por isoleucina ocorreu em 17 A e por arginina em 2. Em três amostras a mutação ocorreu no códon 84 com troca do ácido glutâmico por lisina. Nenhuma mutação foi encontrada nos genes *gyrB* e *parE*. Este trabalho demonstra que o alto índice de resistência dos isolados em *E. coli* envolve a aquisição de múltiplas mutações em *gyrA*. As mutações em *gyrB* e *parE* são menos freqüentes.

VILA et al (1994) pesquisaram mutações na QRDR nos genes *gyrA* e *gyrB* de 27 isolados clínicos de *E. coli*. A CIM para CIP variou entre 0,007 e 128 µg/mL e de 2 a 2000 µg/mL para o NAL. Os 15 isolados com CIM para CIP ≥ 1 µg/mL mostraram mudança da serina 83 por leucina. Nos 11 isolados clínicos com CIMs ≥ 8 µg/mL para CIP foi encontrada uma dupla mutação, em serina 83 e aspartato 87 na subunidade A da DNA girase. Todos os isolados com CIM ≥ 128 µg/mL para o NAL mostraram uma mutação em *gyrA* no códon 83 que acarretou troca da serina por leucina. Somente em um dos 27 isolados clínicos manifestou-se a troca do aminácido lisina por ácido glutâmico no códon 447 na subunidade B da DNA girase, demonstrando a predominância dos mutantes *gyrA* sobre *gyrB*. O autor observou ainda que uma mutação na serina 83 é suficiente para gerar alto nível de resistência ao NAL, enquanto uma segunda mutação, geralmente em asparagina 87 na subunidade A da DNA girase, ocupa um papel complementar no desenvolvimento de cepas com alto nível de resistência à CIP.

Na Alemanha, LEHN et al. (1996) relataram 19 amostras *E. coli* resistentes às fluorquinolonas. Todas apresentaram uma mutação no aminoácido 83 do gene *gyrA*, o que levou à substituição de serina por leucina. Dezoito amostras tinham também uma mutação no aminoácido 87, em 16 amostras houve substituição de aspartato por asparagina e em 2 amostras a troca foi de aspartato por glicina.

O encontro de mutações simples no gene *gyrA* das amostras sensíveis à ciprofloxacina é preocupante, pois a seleção de mutantes adicionais poderia ser favorecida com a presença das fluorquinolonas. Geralmente, os laboratórios de microbiologia utilizam a técnica de difusão em ágar para predizer a sensibilidade aos antimicrobianos. Como esta técnica não fornece a CIM, não é possível observar a elevação da CIM para ciprofloxacina apresentadas por estas amostras com mutações simples. Sugere-se que os laboratórios testem o ácido nalidíxico como um marcador para avaliar a presença de mutações simples no gene *gyrA*, já que a resistência às quinolonas resulta principalmente das mutações sequenciais e acumulativas. Assim, caso o clínico optasse pelo tratamento com quinolonas, a presença de mutações adicionais poderia ser observada e correlacionada ou não à falência terapêutica (ROBERT, 2001).

Considerando a freqüência da infecção urinária e a grande diferença no perfil de sensibilidade das bactérias nos diversos locais onde foram estudadas, torna-se necessário o conhecimento local da prevalência e do padrão de resistência antimicrobiana. A freqüente observação do comportamento bacteriano frente aos antimicrobianos ajuda não somente a prever o futuro da resistência bacteriana, mas também contribui para a instituição de uma terapêutica adequada.

Em relação às quinolonas, o presente estudo alerta para o aumento específico da resistência a esses fármacos e sugere que o ácido nalidíxico seja usado como marcador de resistência às fluorquinolonas em *E. coli*.

7 CONCLUSÕES

- I. A taxa de resistência geral às quinolonas nas amostras avaliadas neste estudo foi de 13,8 %.
- II. A comparação entre os métodos de difusão e diluição em ágar mostrou uma boa relação para as quinolonas testadas, sensibilidade entre 97%-98% e especificidade de 100% .
- III. O ácido nalidíxico revelou-se um bom marcador preditivo da sensibilidade às fluorquinolonas em *E. coli* no teste de difusão em ágar:
 - As 333 amostras sensíveis ao ácido nalidíxico eram também sensíveis à norfloxacin, ciprofloxacina e gatifloxacina testadas pelo método de referência.
 - As 53 amostras resistentes ao ácido nalidíxico eram classificadas como resistente, sensível ou intermediário às fluorquinolonas pelo método de referência. Nas amostras com resistência somente ao ácido nalidíxico houve uma significativa elevação na CIM da ciprofloxacina.

A sensibilidade desse método de triagem foi de 100% e especificidade de 95%. Tais resultados nos permitem sugerir que o ácido nalidíxico pode ser empregado como marcador de resistência às quinolonas, no antibiograma pelo método de difusão em ágar, na rotina laboratorial.
- IV. O sequenciamento de algumas amostras evidenciou que a presença de mutação única está relacionada com resistência ao ácido nalidíxico e elevação da CIM para as fluorquinolonas.
- V. Nas amostras de *E. coli* resistentes a todas as quinolonas, a presença de três mutações, duas no alvo principal e uma no alvo secundário, confirmou a correlação entre múltiplas mutações e a expressão de alto nível de resistência.

- VI. O número de isolados de *E. coli* com alto nível de resistência foi mais freqüente entre os homens, na população estudada.
- VII. Confirmou-se o elevado percentual de *E. coli* resistente ao sulfametoxazol/trimetoprim (46,8%).
- VIII. A nitrofurantoína apresentou um bom percentual de sensibilidade (94,6%) dentre as 385 amostras de *E. coli* analisadas. Quando consideradas apenas as amostras resistentes às quinolonas, este percentual caiu para 72,0%.

REFERÊNCIAS

- ACAR, J.F; GOLDESTINE, F.W. Trends in Bacterial Resistance to Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 24, Sup. 1, p. S67-73, 1997.
- AMYES, S.B.G. *et al.* Trovafloxacin: a novel extended spectrum quinolone. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. Birmingham, v. 39, p. 1-97, 1997.
- ANDRIOLE, V.T. Current infectious disease drugs. **Current Medicine**. Philadelphia, p. 102, 1996.
- ANDRIOLE, V.T. **The quinolones**. 2 ed. New York : Academic Press, p.417-419, 1998.
- BARLOW, A.M. Nalidixic acid in infections of urinary tract. **British Medical Journal**. London, v. 2, p. 1308-1310, 1963.
- BEBEAR, C.M. *et al.* In vitro activity of trovafloxacin compared to those of five antimicrobials against *Micoplasmas* including *Micoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* fluoroquinolone-resistant isolates that have been genetically characterized. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v. 44, n. 9, p. 2557-2560, 2000.
- BERGAN, T. Pharmacokinetics of the fluoroquinolones. In: ANDRIOLE, V. T. **The quinolones**. 2 ed. New York: Academic Press, p.144, 1998.
- BERDICHEVSKI, R.H. *et al.* Prevalência de uropatógenos e sua resistência aos antimicrobianos em uroculturas realizadas no Hospital São Lucas da PUCRS. **AMRIGS**. v. 42, n. 3, p. 137-142, 1998.
- BLONEAU, J. M.; BROWN, E. M.; WOOD, M.J. Moxifloxacin, a new respiratory quinolone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Birmingham, v. 43, p.1-100, 1999.
- BLUM, M. D. *et al.* Temafloxacin syndrome: review of 95 cases. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 18, p. 946-950, 1994.
- BROWN. J. C. & AMYES, S. G. B. Quinolone resistance. In: WOODFORD, N & JOHNSON, A. P. **Molecular bacteriology – Protocols and clinical applications**. Totowa: Humana Press, p. 617-639, 1998.
- BRISSE, S. *et al.* Comparative *in vitro* activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter aerogenes* clinical isolates with alterations in Gyr A and Par C Proteins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v. 43, n. 8, p. 2051-2055, 1999a.

BRISSE, S. *et al.* Association of alterations in *ParC* and *GyrA* Proteins with resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecium* to nine different fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v. 43, n. 10, p. 2513-2516, 1999b.

BRYSKIER, A.; CHANTOT, J.F. Classification and Structure activity relationships of fluoroquinolones. **Drugs**. New Zeland, v. 49, n. 2, p. 16-28, 1995.

CAMOZZATO, A. Quinolonas: Gênese e propriedades terapêuticas da terceira geração . **Caderno Especial de Terapia**. p.45-53, 1999.

CARVALHO, W.A. Quinolonas. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 5, p. 123-145, 1998.

CLARK, C. *et al* Activities of clinafloxacin, alone and in combination with other compounds, against 45 gram-positive and negative organisms for which clinafloxacin MICs are high. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v.43, p. 190-198, 1999.

CLARRIDGE, J.E. *et al.* Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections. **Cumitech 2B – Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, p. 7, 1998.

DOMAGALA, J.M. *et al.* New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. **J Med Chem**, Columbus, v. 29, p. 394-404, 1986.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV and the 4 quinolones. **Microb Molec Biol Reviews**. Washington, v. 61, n. 3, p. 377-392, 1997.

DRLICA, K. Mechanism of fluoroquinolone action. **Current Opinion in Microbiology**. London, v.2, p. 504-508, 1999a.

DRLICA, K. Mechanisms of fluoroquinolone action and resistance. In: MANDELL, L. **Fist International Moxifloxacin Symposium**, 1 ed., p. 75-83, Berlim, 1999b.

DRLICA, K. A strategy for fighting antibiotic resistance. **ASM News**. v.67, n. 1, p. 27-33, 2001.

EDNIE, L.M. *et al.* Comparative activities of clinafloxacin against gram-positive and negative bacteria. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v.42, n. 5, p. 1269-1273, 1998.

ENA, J. *et al.* Emergence of ciprofloxacin resistanse in *Escherichia coli* isolates after widespread use of fluoroquinolones. **Diagn Microbiol Infec. Dis**. v. 30, p. 103-107, 1998.

EVERETT, M.; JIN, Y. F.; RICCI, V.; PIDDOCK, L. J. V. Contributions of individual mechanisms to fluorquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 40, n. 10, p. 2380-2386, 1996.

FILE, T.M. Fluoroquinolones: Today and into the Future. **Infec Dis Treat updates**. p. 1221-1239, March, 2001.

FINCH, R.G. *et al* Sparfloxacin: focus on clinical performance. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. Birmingham, v. 37, p. 1-167, 1996.

FORBES, B. A.; SAHN, D. F.; WEISSFELD, A. S. Infections of the Urinary Tract. In: ____;____;____. **Bailey Scott's Diagnostic Microbiology**. 10. Ed. St. Louis: Mosbby, p. 350-362, 1998.

GALES, A. C.; GORDON, K. A.; WILKE, W. W.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. Occurrence of single-point IA mutations among ciprofloxacin-susceptible *Escherichia coli*. **Diagnostic Microbiology and Infectious**. v. 36, p. 61-64, 2000a.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; GORDON, K. A.; SADER, H. S.; WILKE, W. W.; BEACH, M. L.; PFALLER, M. A.; DOERN, G. V. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.45, p. 1295-303, 2000b.

GALES, A.C. **Avaliação do Perfil de Sensibilidade e dos Mecanismos de Resistência às Quinolonas em Amostras de *Escherichia coli* Isoladas de Pacientes com Infecção do Trato Urinário na América Latina**. Tese (mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias), Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP-EPM, 2001.

GEORGIU, M.; MUÑOZ, R.; ROMÁN, F. *et al*. Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v. 40, n. 7, p. 1741-1744, 1996.

GOETTSCH, W.; VAN PELT, W.; NAGELKERKE, N.; HENDRIX, M. G. R.; BUITING, A. G. M.; PETIT, P. L.; SABBE, L. J. M.; VAN GRIETHUYSEN, A. J. A.; NEELING, A. J. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 46, p. 223-228, 2000.

HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; JALAVA, J.; SIITONEN, A.; HUOVINEN, P. Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in *Salmonellas* and

validation of nalidixic acid screening test. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v.37, n. 11, p.3272-3577, 1999.

HEISIG, P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. Washington, v. 40, n. 4, p. 879-885, 1996.

HOOPER, D. C. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases and anti-topoisomerase resistance. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 27, n. 1, p.54-63, 1998.

HOOPER, D.C. O que há de novo no tratamento com quinolonas. **Hospital Practice**. Minneapolis, p. 44-49, 2000.

HOOPER, D. C. Quinolones. In: MANDELL, G.L. *et al.* **Mandell, Douglas and Bennette's Principles and practices of Infectious Diseases**. 5 ed., p. 404-423, New York, 2000.

HOOPER, D.C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v.7, p.337-341, 2001.

HUOVINEN, P. Increases in rates of resistance to trimethoprim. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 24, s. 1, p. S63-6, 1997.

JACOBY, G. A.; CHOWN, N.; WAITES, K. B. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v. 47, n. 2, p. 559-562, 2003.

JEKEL, F. F.; ELMORE, J. G.; KATZ, D. L. **Epidemiologia Estatística e Medicina Preventiva**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

JONES, M. E. *et a.* Comparative activities of clinafloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin and nonquinolones linozolid, quinupristin-dalfopristin, gentamicin, and vancomycin against clinical isolates of ciprofloxacin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v. 43, n. 2, p. 421-423, 1999.

JONES, D.; PELL, P. A.; SNEATH, P. H. A. Maintenance of bacteria on glass beads at - 60°C a - 76°C, In: **Maintenance of Microorganisms, a Manual of Laboratory Methods**. ed. Academic Press, Inc., Londres, p. 35-45, 1994.

KAPOOR, H. & AGGARWAL, P. Resistance to quinolones in pathogens causing urinary tract infections. **J Commun Dis**. v. 29, i. 3, p. 263-267, Sep 1997.

KARLOWSKY, Y. *et al.* Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States.

Antimicrobial Agents Chemotherapy. Washington, v.46, n. 8, p. 2540-2545, 2002.

KING, D. *et al.* New classification and update on the quinolone antibiotics. **American Family Physician.** Leawood, v.6, p. 2741, 2000.

KOHLER, T. *et al.* Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** Washington, v. 41, p. 2540-2543, 1997.

KUMAGAI, Y. *et al.* Quinolone-resistance mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** Washington, v.40, p. 710-714, 1996.

LAMIKANRA, A. & NDEP, R. B. Trimethoprim resistance in urinary tract pathogens in two Nigerian Hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy.** v. 23, p. 151-154, 1989.

LEHN, N.; STÖWER-HOFFMANN, J.; KOTT, T.; STRASSNER, C.; WAGNER, H.; KRÖNKE, M.; SCHNEIDER-BRACHERT, W. Characterization of clinical isolates of *Escherichia coli* showing high levels of fluoroquinolone resistance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** v. 34, n. 3, p. 597-602, 1996.

LOBER, S.; ZIEGE, S.; RAU, M. *et al* Pharmacokinetics of gatifloxacin and interaction with an antacid containing aluminum and magnesium. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** Washington, v. 43, p. 1067-1071, 1999.

LOPES, A. A. *et al.* Increase in the frequency of norfloxacin and ciprofloxacin resistance of bacteria isolated from urine culture. **Rev Assoc Med Bras.** v. 44, i. 3, p. 196-200, Jul-Sep 1998.

MARÍTNÉZ-MARTÍNEZ, L.; GARCIA, I.; BALLESTA, S.; BENEDÍ, V. J.; HERNÁNDEZ-ALLÉS, S.; PASCUAL, A. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** v. 42, n. 7, p. 1850-1852, 1998.

McCUE, J.D. Urinary tract infection: treatment guidelines for older women. **Consultant.** v. 37, n. 8, p. 2135-2140, 1997.

MENDES, C.; SADER, H.; DIAS, C. *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of sparfloxacin relative to other oral antibiotics against 1125 bacterial isolates from 10 medical centers in Brazil. **Brazilian Jornal of Infectious Diseases.** v. 2, p. 18-24, 1998.

MORRISSEY, I.; GEORGE, J. Activities of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* type II topoisomerases purified as recombinant proteins. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** Washington, v. 43, n. 11, p. 2579-2585, 1999.

National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, M7-A5. Wayne, PA, 2000.

National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth informational supplement, M100-S12. Wayne, PA, 2002.

National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard, M2-A7. Wayne, PA, 2000.

NEU, H. C. Chemical Evolution of the fluoroquinolone antimicrobial. **Agents Am J Med.** v. 87, n. 6, p. 29, 1989.

OPLUSTIL, C. P.; NUNES, R.; MENDES, C. Multicenter evaluation of resistance of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Shigella* spp isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases.** v.5, n. 1, p. 8-12, 2001.

NICOLLE, L. E. Urinary tract pathogens in complicated infection and in elderly individuals. **The Journal of Infectious Disease.** Washington, v. 183, s. 1, p. S5-8, 2001.

PAN, X, FISHER, L. DNA Gyrase and Topoisomerase IV are dual targets of ciprofloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* v. 42, n. 11, p. 2810-2816, 1998.

PETERSON, L. R. et al. Quinolone molecular structure-activity relationships: What we have learned about improving antimicrobial activity. **CID.** v. 33, s. 3, p. S180-186, 2001.

QUEIRO, J.A. *et al.* Servicio de Urologia, Hospital Universitario de La Fe, Valencia. **Actas Urol Esp.** v. 25, i. 8, p. 567-72, Sep 2001.

ROBERT, J. *et al.* Trends in quinolone susceptibility of Enterobacteriaceae among inpatients of a large university hospital: 1992-98. **Clin Microb Infect.** v. 7, n. 10, p.553-561, 2001.

RONALD A. R. & PATTULLO A.L.S. The natural history of urinary tract infection in adults. **Medical Clinical of North America.** v.75, p. 299-312,1991.

SADER, H; BOTOLATO, V. Avaliação da taxa de mutação espontânea e da indução de resistência a ciprofloxacina em amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isoladas na cidade de São Paulo. **Rev Bras Patolog Clínica.** v.30, n. 3, p.125-132, 1994.

SANDERS, C.C. Mechanisms responsible for cross-resistance and dichotomous resistance among the quinolones. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 32 (suppl 1), p.S1-8, 2001.

SCHECHTER, M. & MARANGONI, D. V. Infecções do Trato Urinário. **Doenças Infecciosas: conduta diagnóstica e terapêutica**. 2. Ed. p. 425-455, Rio de Janeiro, 1998.

SHEN, L.L. Molecular Mechanisms of DNA Gyrase Inhibition by quinolone antibacterials. **Advances in Pharmacology**. v. 29, p. 285-304, 1994.

SINDELAR, R et al. Quinolone resistance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 44, n. 12, p. 3337-3343, 2000.

SMITH, R. H.; JONES, S.E. Quinolones may induce hepatitis. **British Medical Journal**. v.314, p. 814, 1997.

SNYDMAN, D. *et al.* Comparative in vitro activities of cinafloxacin and trovafloxacin against 1000 isolates on *Bacteroides fragilis* Group: Effect of the medium on Test Results. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, v.44, n. 6, p. 1256-1259, 2000.

SORBEL J. D. & KAYE, D. Urinary tract Infections. In: Mendell, G.L., BENNET, J.E., DOLIN, R. (ed). – Mendell, Douglas and Bennett, S **Principles and Practices of Infectious Diseases**. 5 ed. New York: Churchill Livingstone. p. 773-805, 2000.

SUCH, B.; LORBER, B. Quinolonas. In: CUNHA, B. **Clínicas Médicas da América do Norte. Terapia Antimicrobiana II**. v. 4. Rio de Janeiro: Interlivros, p. 859-884, 1995.

STAMM, W. E. & NORRBY, S.R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. **The Journal of Infectious Disease**. Washington, v. 183, s. 1, p. S1-4, 2001.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, cap. 42, p. 684-713, 1999.

TENOVER, F.C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: An overview. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 33 (suppl 3), p.S108-115, 2001.

TRAN, J. H. & JACOBY, A. Mechanism of plasmide-mediated quinolone resistance. **PNAS**. v. 99, n. 8, p. 5638-5642, 2002.

TRUN, N. J.; MARKO, J. F. Architecture of a bacterial chromosome. **ASM News**. V. 64, n. 5, p. 276-283, 1998.

VARON, E. et al. *parC* and *gyrA* be interchangeable initial targets of some fluorquinolone in *S. pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. Washington, v. 43, n.2, p. 302-306, 1999.

VILA, J.; RUIZ, J.; MARCO, F.; BARCELO, A.; GOÑI, P.; GIRALTI, E. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 38, n.10, p. 2477-2479, 1994.

VROMEN, M.; VAN DER VEM, A. J. A. M.; KNOLS, A.; STOBBERINGH, M. E. E. Antimicrobial resistance patterns in urinary isolates from nursing home residents. Fifteen years of data reviewed. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 44, p. 113-116, 1999.

WAGSTAFF, A.J.; BALFOUR, J. Grepafloxacin. **Drugs**. New Zeland, v. 53, n. 5, p. 8817-824, 1997.

WRIGHT, D. H.; BROWN, G. H.; PETERSON, M. L.; ROTSCHAFER, J. C. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 46, p. 669-683, 2000.

WEBER, G.; RIESENBERG, K.; SCHAEFFER, F.; PELED, N.; BORER, N.; YAGUPSKY, P. Changing trends in frequency and antimicrobial resistance of urinary pathogens in outpatient clinics and a hospital in Southern Israel, 1991-1995. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 16, n.11, p. 834-838, 1997.

WINSTANLEY, T. G.; LIMB, D. I.; EGGINGTON, R.; HANCOCK, F. A 10 year survey of antimicrobial susceptibility of urinary tract isolates in the UK: the Microbe Base project. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 40, p. 591-594, 1997.

YOSHIDA, H.; BOGAKI, M.; NAKAMURA, M.; NAKAMURA, S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. Washington, v. 34, n.6, p. 1271-1272, 1990.

ZHAO, X.; DRLICA, K. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants; a general strategy derived from fluoroquinolone studies. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 33 (suppl 3), p.S147-156, 2001.

ZHANEL, G. G. et. al. A Canadian National Surveillance Study of urinary Tract Isolates from Outpatients: Comparison of the Activities of Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Ampicillin, Micillinam, Nitrofurantoin, and Ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 4, p. 1089-1092, 2000.

ZHANG, M. Q.; HAEMERS, A. Quinolone antimicrobial Agents, structure activity relationships. **Pharmazie**. v. 46, n. 10, p. 687-700, 1991.

ZIRNSTEIN,G. *et al.* Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: Detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v.37, n. 10, p.3276-3280, 1999.

ZOLER, M. L. Quinolones moving to first-line care for UTIs. **Family Practice News**. v. 29, n. 22, p. 1-2, 1999.